

**Efeitos do treinamento físico e do destreino sobre
propriedades moleculares e mecânicas de cardiomiócitos
isolados de ratos normotensos e hipertensos**

Miguel Araujo Carneiro Júnior

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas
(Fisiologia Cardiovascular)

**Doutorado em Ciências Fisiológicas
(Fisiologia Cardiovascular)**

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Junho de 2013

MIGUEL A. CARNEIRO JÚNIOR

**Tese de
DOUTORADO**

2013

Ficha Catalográfica

Carneiro Júnior, Miguel Araujo, 1983

Efeitos do treinamento físico e do destreinamento sobre propriedades moleculares e mecânicas de cardiomiócitos isolados de ratos normotensos e hipertensos. [Vitória] 2013

ix, 111 p., 29,7 cm (UFES, D. Sc., Ciências Fisiológicas, 2013)

Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Mill

1. Atividade Física
2. Inatividade
3. Hipertensão
4. Cardiomiócito
5. Transiente de Cálcio
6. Marcadores Moleculares de Hipertrofia

Efeitos do treinamento físico e do destreinamento sobre propriedades moleculares e mecânicas de cardiomiócitos isolados de ratos normotensos e hipertensos

Miguel Araujo Carneiro Júnior

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Cardiovascular.

Aprovada em 14/06/2013 por:

Prof. Dr. José Geraldo Mill - Orientador, PPGCF-UFES

Prof^ª. Dr^ª. Edilamar Menezes de Oliveira - USP

Prof^ª. Dr^ª. Ivanita Stefanon - PPGCF-UFES

Prof. Dr. José Hamilton Matheus Nascimento - UFRJ

Prof. Dr. Thales Nicolau Prímola-Gomes - UFV

Coordenadora do PPGCF: Prof^ª. Dr^ª. Ivanita Stefanon

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória, 14 de Junho de 2013

Aos meus pais e irmã, pelas minhas origens.

À minha linda, pelo nosso amor.

À memória dos meus queridos primos e avós.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar e guiar meus passos nessa caminhada, me dando força e fé para continuar sempre e por permitir que esse sonho pudesse ser realizado.

Aos meus pais Miguel e Isabel e minha irmã Magda pela base sustentadora da família, pelo amor incondicional e por me fazer lembrar sempre das minhas origens.

À minha Angelita, pela grande mulher que está sempre ao meu lado, pelo amor, carinho, paixão, paciência e incentivo constante. Ao Lucas pelo nosso grande companheirismo e “por cuidar da mamãe”.

A todos os meus familiares pelas orações, pelo carinho, e por ser a melhor família do mundo. Em especial às minhas queridas vovós Regina e Francisca (*in memoriam*).

Aos professores, orientadores e amigos José Geraldo Mill e Antônio José Natali, pelos apoios, exemplos, ensinamentos, conselhos, competência, ética, pela admirável humildade e pela referência de verdadeiros cientistas e grandes homens.

Ao professor e amigo Thales Nicolau Prímola-Gomes pelos conselhos, auxílios e orientação constante. E também pelos momentos de bate-papo e descontração.

Ao professor e parceiro Leonardo Bonato Félix pela boa vontade e apoio, e pela criação dos programas para análise dos parâmetros celulares no Departamento de Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Viçosa.

À professora Edilamar Menezes de Oliveira pelo auxílio, acolhimento, orientação e viabilização da realização dos experimentos no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Exercício da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo.

Ao professor Jader Santos Cruz do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais pela nossa importante parceria que vem de longa data.

Aos grandes amigos Judson Fonseca Quintão-Júnior, Lucas Rios Drummond, Victor Neiva Lavorato e Filipe Rios Drummond pelos momentos incansáveis de trabalhos, discussões, persistência e fé, durante toda nossa jornada com o treinamento físico dos animais experimentais, medidas cardiovasculares, experimentos de contratilidade celular e medidas de Ca^{2+} . E também pelos nossos bate-papos, gargalhadas, “brigas” e festas.

Ao grande amigo e professor Wellington Lunz, pela amizade que vem de muito tempo. Um irmão que sempre me acolheu e aconselhou, do qual tenho muito orgulho. Foi ele quem me apresentou ao professor José Geraldo Mill, possibilitando a realização do meu doutorado.

Aos amigos do Laboratório de Biologia do Exercício da Universidade Federal de Viçosa: Karina, Cynthia, Gilton, Luís Henrique, Aurora, Mateus, Érica, Ana Paula, Márcia, Helton, Filipe Belfort, Pedro, Luciano, Anselmo, Daise e Regiane, pela nossa convivência, pelos auxílios, pelos bons momentos de trabalho, pelas trocas de informações, pelas amizades.

Aos amigos do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular da Universidade Federal do Espírito Santo: Divanei, Elis, Ludimila, Rebeca, Marcelo, Eduardo, Luciana e Enildo pela boa convivência e pela amizade.

Ao amigo Marco Aurélio Amadeu, que me apoiou incondicionalmente durante minha estadia em São Paulo, pela ajuda nos experimentos de biologia molecular e pela parceria que ficará para sempre.

Aos velhos e grandes amigos Rogério Santos e Carlos Nazareno, que mesmo estando longe, sei que sempre estão por perto.

Aos amigos de Viçosa, Gilton Gomes, Reinaldo Vieira, Márcio Ribeiro, Túlio Junqueira, Bárbara Braga e Juliana Silveira, pelo companheirismo.

À Universidade Federal do Espírito Santo, Universidade Federal de Viçosa e Universidade de São Paulo, e a todos os seus funcionários que contribuíram direta ou indiretamente pela possibilidade de realização desse trabalho.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, que proporcionou a realização dos experimentos de microscopia confocal.

À professora Ivanita Stefanon e professores José Hamilton Matheus Nascimento e Leonardo dos Santos pela disponibilidade para participação na minha defesa de tese.

Ao CNPq, FAPES e FAPEMIG, pelo fundamental auxílio financeiro.

Enfim, a todos que de alguma forma participaram direta ou indiretamente da realização desse trabalho, da concretização desse sonho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	11
LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS	13
RESUMO	17
ABSTRACT	20
1. INTRODUÇÃO	23
1.1 – Acoplamento excitação-contração e o transiente intracelular global de Ca^{2+} do coração:	23
1.2 – Hipertensão arterial, treinamento físico e destreinamento: relações com o acoplamento excitação-contração e o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ do coração:	26
2. OBJETIVOS	34
2.1- Objetivo Geral:	34
2.2- Objetivos Específicos:	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS:	36
3.1 - Animais de experimentação e tratamentos:	36
3.2 - Programa de treinamento físico e destreinamento:	37
3.3 - Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Frequência Cardíaca de Repouso (FCR):	38
3.4 - Isolamento dos cardiomiócitos:	39
3.5 - Soluções de isolamento:	40
3.6 - Solução de perfusão tampão HEPES:	41
3.7 - Contratilidade celular:	41
3.8 - Medidas do transiente de $[Ca^{2+}]_i$:	43
3.9 - Expressão de proteínas cardíacas:	47
3.10 - Avaliação da expressão gênica cardíaca:	48
3.11 - Análise estatística:	49

4. RESULTADOS:	52
4.1 - Características gerais e parâmetros cardiovasculares:	52
4.2 - Medida da capacidade física:.....	56
4.3 - Medida do transiente de $[Ca^{2+}]_i$:.....	58
4.4 - Medida da contratilidade celular:.....	64
4.5 - Medida da expressão protéica:.....	68
4.6 - Medida da expressão gênica:	70
5. DISCUSSÃO	74
6. CONCLUSÃO	85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
8. ANEXOS.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso corporal, peso dos ventrículos esquerdo e direito e peso relativo dos ventrículos direito e esquerdo dos animais normotensos e hipertensos.....53

Tabela 2. Pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca de repouso (FCR) dos animais normotensos e hipertensos antes e após os tratamentos.....55

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Representação do programa utilizado para aquisição das imagens e dos registros das contrações dos cardiomiócitos isolados.....42
- Figura 2. Traçado representativo de uma contração celular estimulada na frequência de 1 Hz, e os parâmetros avaliados.....43
- Figura 3. Cardiomiócito isolado incubado com o indicador fluorescente de Ca^{2+} (Fluo-4 AM).....45
- Figura 4. A) Traçados representativos das imagens de fluorescência para o transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em cardiomiócitos isolados de ratos. B) Resultado da análise da imagem do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e os parâmetros avaliados.....46
- Figura 5. Tempo total de exercício até a fadiga (TTF) dos animais dos grupos experimentais no teste de desempenho após o treinamento e o destreinamento.....57
- Figura 6. Registros típicos das imagens de fluorescência e os traçados gerados para o transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos experimentais, incubados com o indicador fluorescente de Ca^{2+} (Fluo-4 AM), e estimulados eletricamente na frequência de 1 Hz. O sinal é mostrado como taxa de intensidade de fluorescência (F/F_0). A fluorescência máxima (F) foi normalizada em função da fluorescência mínima (F_0) obtida antes da estimulação elétrica.....59
- Figura 7. Transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais normotensos (barras abertas) e hipertensos (barras fechadas). (A) Amplitude do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (F/F_0). (B) Tempo para o pico do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (ms). (C) Tempo para 50% do decaimento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (ms).....61

Figura 8. Correlações entre o tempo total de exercício até a fadiga (TTF) e a amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e tempo para 50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$ dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais normotensos (A, C e E) e hipertensos (B, D e F).....63

Figura 9. Registros representativos das contrações dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos experimentais.....65

Figura 10. Contratilidade dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais normotensos (barras abertas) e hipertensos (barras fechadas). (A) Amplitude de contração (% de variação do comprimento celular de repouso). (B) Velocidade máxima de contração ($\mu\text{m/s}$). (C) Velocidade máxima de relaxamento ($\mu\text{m/s}$).....67

Figura 11. Expressão protéica no ventrículo esquerdo dos animais normotensos (barras abertas) e hipertensos (barras fechadas). (A) Fosfolambam total (FLBt). (B) Fosfolambam fosforilada na serina 16 (FLB_{ser16}). (C) Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a). (D) Canal trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX). (E) Relação FLBt/SERCA2a. As bandas alvo foram normalizadas pela expressão da GAPDH.....69

Figura 12. Expressão gênica no ventrículo esquerdo dos animais normotensos (barras abertas) e hipertensos (barras fechadas). (A) Fator natriurético atrial (FNA). (B) α -actina esquelética. (C) Relação α/β -miosina de cadeia pesada. Os genes alvo foram normalizados pela expressão gênica da GAPDH.....71

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

- α -MCP – α -miosina de cadeia pesada
 β -MCP – β -miosina de cadeia pesada
 AEC – acoplamento excitação-contração
 AM – acetoximetil-éster
 AMP – monofosfato de adenosina
 ANOVA – análise de variância
 ATP – trifosfato de adenosina
 ATPase – enzima que catalisa a hidrólise do ATP para produção de energia
 Ca^{2+} – íon cálcio
 CaCl_2 – cloreto de cálcio
 CaMKII – proteína quinase II ativada pela via da Ca^{2+} /calmodulina
 c.c.r. – comprimento celular de repouso
 cDNA – DNA complementar
 CEUA – Comissão de Ética para Uso de Animais
 COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
 DHPR – receptores de dihidropiridina
 DMSO – dimetil-sulfóxido
 DNA – ácido desoxirribonucleico
 dNTPS – desoxinucleotídeos trifosfato
 DTT – ditioneitol
 EDTA – ácido etilenodiamino tetracético
 EGTA – ácido etilenoglicol tetracético
 EPM – erro padrão da média
 F – fluorescência máxima
 F₀ – fluorescência mínima
 FC_{máx} – frequência cardíaca máxima
 FCR – frequência cardíaca de repouso
 FKBP12.6 – proteína de ligação FK506
 FLB – fosfolambam
 FLBt – fosfolambam total
 FLB_{ser16} – fosfolambam fosforilada no resíduo de serina 16

FLB_{thr17} – fosfolambam fosforilada no resíduo de treonina 17
FNA – fator natriurético atrial
GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HEPES – ácido etanosulfônico-hidroxietil piperazina
HCl – ácido clorídrico
HC8 – hipertenso controle por 8 semanas
HC12 – hipertenso controle por 12 semanas
HDT – hipertenso treinado por 8 e destreinado por 4 semanas
HT8 – hipertenso treinado por 8 semanas
Hz – hertz (frequência)
ICa – corrente de entrada de Ca²⁺
IgG – imunoglobulina
Ito – corrente repolarizante transitória de efluxo de K⁺
K⁺ – íon potássio
KCl – cloreto de potássio
MgCl₂ – cloreto de magnésio
MgSO₄ – sulfato de magnésio
Na⁺ – íon sódio
NaCl – cloreto de sódio
NaF – fluoreto de sódio
NaH₂PO₄ – fosfato monossódico
NCX – canais trocadores de Na⁺ e Ca²⁺
NC8 – normotenso controle por 8 semanas
NC12 – normotenso controle por 12 semanas
NDT – normotenso treinado por 8 e destreinado por 4 semanas
NT8 – normotenso treinado por 8 semanas
O₂ – oxigênio
PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida
PAS – pressão arterial sistólica
PC – peso corporal
PKA – proteína quinase A
PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonil
PV – peso dos ventrículos

PVD – peso do ventrículo direito

PVE – peso do ventrículo esquerdo

RNA – ácido ribonucleico

RNAm – RNA mensageiro

rpm – rotações por minuto

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase em tempo real

RyR2 – canais receptores de rianodina do tipo 2

SDS – dodecil sulfato de sódio

SERCA2a – isoforma cardíaca da Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático

SHR – *Spontaneously Hypertensive Rat*

TBS – tris salina tamponada

T – tempo

TTF – tempo total de exercício até a fadiga

V – volt

VMC – velocidade máxima de corrida

$\text{VO}_{2\text{máx}}$ – volume máximo de oxigênio

RESUMO

RESUMO

Efeitos do treinamento físico e do destreinamento sobre propriedades moleculares e mecânicas de cardiomiócitos isolados de ratos normotensos e hipertensos.

Introdução. O treinamento físico aeróbio provoca benefícios sobre a função cardíaca que estão relacionados a adaptações celulares e subcelulares. Estudos mostram que o treinamento físico aeróbio aumenta a expressão de proteínas reguladoras do transiente intracelular global de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), o transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e a contratilidade de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de ratos normotensos, embora o destreinamento reverta essas adaptações. Todavia, os efeitos do treinamento físico e do destreinamento sobre esses parâmetros em corações de ratos hipertensos, não são conhecidos. **Objetivos.** Investigar os efeitos do treinamento físico aeróbio de baixa intensidade e do destreinamento sobre parâmetros cardiovasculares e sobre propriedades moleculares e mecânicas de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de ratos normotensos e hipertensos. **Materiais e Métodos.** Ratos Wistar [peso inicial de $385,3 \pm 6,6$ g (média \pm erro padrão da média) e pressão arterial sistólica (PAS) de $110,7 \pm 0,5$ mmHg] e SHR [*Spontaneously Hypertensive Rats* (peso inicial de $357,5 \pm 4,1$ g e PAS de $178,4 \pm 1,3$ mmHg)] com 16 semanas de idade, foram distribuídos aleatoriamente em 8 grupos (n=8): NC8 e HC8 – normotensos e hipertensos controles por 8 semanas; NT8 e HT8 – normotensos e hipertensos treinados a 50-60% da velocidade máxima de corrida em esteira rolante por 8 semanas; NC12 e HC12 – normotensos e hipertensos controles por 12 semanas; NDT e HDT – normotensos e hipertensos treinados a 50-60% da velocidade máxima de corrida em esteira rolante por 8 semanas e destreinados por 4 semanas. A frequência cardíaca de repouso (FCR) e a PAS foram determinadas antes e após os tratamentos, através de um sensor e pletismografia de cauda, respectivamente. O tempo total de exercício até a fadiga (TTF) foi determinado através de um teste de capacidade máxima para o exercício. Após os tratamentos, a eutanásia dos animais foi realizada através de deslocamento cervical, seguida de toracotomia. O coração foi removido, lavado e canulado através da artéria aorta em um sistema de perfusão, sendo que os cardiomiócitos do ventrículo esquerdo foram isolados através de digestão enzimática (colagenase). Para a determinação do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, os cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo foram incubados com o indicador fluorescente de Ca^{2+} Fluo-4 acetoximetil-ester (Fluo-4 AM) e colocados dentro de uma câmara experimental montada em um microscópio confocal. A contratilidade celular foi determinada através da técnica de alteração do comprimento dos cardiomiócitos, usando-se um sistema de detecção de bordas, com o auxílio de um microscópio invertido. Para ambos os

experimentos, utilizou-se estimulação elétrica de campo (20 V; 1 Hz; ~ 25°C). A expressão das proteínas reguladoras do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ do ventrículo esquerdo foi realizada através de *Western Blot*, e a expressão dos marcadores de hipertrofia cardíaca patológica através de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). **Resultados.** O treinamento físico aeróbio de baixa intensidade aumentou o TTF (NC8, $11,4 \pm 1,5$ vs. NT8, $22,5 \pm 1,4$; HC8, $11,7 \pm 1,4$ vs. HT8, $24,5 \pm 1,3$ min; $P \leq 0,05$), diminuiu a FCR (NT8inicial, 340 ± 8 vs. NT8final, 322 ± 10 ; HT8inicial, 369 ± 8 vs. HT8final, 344 ± 10 bpm; $P \leq 0,05$), e diminuiu a PAS nos animais SHR (HC8, $178,0 \pm 3,2$ vs. HT8, $161,2 \pm 3,6$ mmHg; $P \leq 0,05$). Os animais do grupo HC8 apresentaram lentificação do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (TPico, $83,7 \pm 1,8$ vs. $71,7 \pm 2,4$; T50%Decaimento, $284,0 \pm 4,3$ vs. $264,0 \pm 4,1$ ms; $P \leq 0,05$) e da contratilidade celular (VContração, $86,1 \pm 6,7$ vs. $118,6 \pm 6,7$; VRelaxamento, $57,5 \pm 7,4$ vs. $101,3 \pm 7,4$ $\mu\text{m/s}$; $P \leq 0,05$); aumento na expressão do fator natriurético atrial (FNA) (300%; $P \leq 0,05$), α -actina esquelética (250%; $P \leq 0,05$) e uma diminuição na razão α/β -miosina de cadeia pesada (MCP) (70%; $P \leq 0,05$), comparados aos animais do grupo NC8. O programa de corrida aumentou o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (NC8, $2,39 \pm 0,06$ vs. NT8, $2,72 \pm 0,06$; HC8, $2,28 \pm 0,05$ vs. HT8, $2,82 \pm 0,05$ F/F₀; $P \leq 0,05$), a contratilidade celular (NC8, $7,4 \pm 0,3$ vs. NT8, $8,4 \pm 0,3$; HC8, $6,8 \pm 0,3$ vs. HT8, $7,8 \pm 0,3$ % do comprimento celular de repouso; $P \leq 0,05$) e normalizou a expressão do FNA, α -actina esquelética, e a razão α/β -MCP no ventrículo esquerdo dos animais do grupo HT8. Além disso, aumentou a expressão da Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a) (NC8, $0,93 \pm 0,15$ vs. NT8, $1,49 \pm 0,14$; HC8, $0,83 \pm 0,13$ vs. HT8, $1,32 \pm 0,14$; $P \leq 0,05$), a fosforilação da fosfolambam no resíduo de serina 16 (FLB_{ser16}) (NC8, $0,89 \pm 0,18$ vs. NT8, $1,23 \pm 0,17$; HC8, $0,77 \pm 0,17$ vs. HT8, $1,32 \pm 0,16$; $P \leq 0,05$), e diminuiu a razão fosfolambam total (FLBt)/SERCA2a (NC8, $1,21 \pm 0,19$ vs. NT8, $0,50 \pm 0,21$; HC8, $1,38 \pm 0,17$ vs. HT8, $0,66 \pm 0,21$; $P \leq 0,05$) no ventrículo esquerdo dos animais treinados. Entretanto, todas essas adaptações retornaram aos valores iniciais após 4 semanas de destreinamento, tanto nos animais normotensos quanto nos hipertensos. **Conclusão.** O treinamento físico aeróbio de baixa intensidade provocou adaptações benéficas sobre as propriedades moleculares e mecânicas de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de ratos normotensos e hipertensos. O destreinamento pelo período de 4 semanas, reverteu todos esses benefícios.

Palavras-chave: Atividade física; Inatividade; Hipertensão; Cardiomiócito; Transiente de cálcio; Marcadores moleculares de hipertrofia

ABSTRACT

ABSTRACT

Effects of exercise training and detraining on the molecular and mechanical properties of isolated cardiomyocytes from normotensive and hypertensive rats.

Introduction. The endurance training induces benefits on cardiac function that are related to cellular and subcellular adaptations. Studies show that endurance training increases the expression of transient intracellular global Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) regulatory proteins, the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient and contractility of isolated cardiomyocytes from the left ventricle of normotensive rats, although detraining reverses these adaptations. However, the effects of endurance training and detraining on these parameters in hypertensive rat hearts, are not known. **Aims.** To investigate the effects of low-intensity endurance training and detraining on cardiovascular parameters and molecular and mechanical properties of isolated cardiomyocytes from the left ventricle of normotensive and hypertensive rats. **Materials and Methods.** Male wistar rats [initial weight of 385.3 ± 6.6 g (mean \pm standard error of mean) and systolic blood pressure (SBP) of 110.7 ± 0.5 mmHg] and SHR [Spontaneously Hypertensive Rats (initial weight of 357.5 ± 4.1 g and 178.4 ± 1.3 SBP mm Hg)] with 16 weeks of age, were randomly distributed into 8 groups (n = 8): NC8 and HC8 - normotensive and hypertensive controls for 8 weeks; NT8 and HT8 - normotensive and hypertensive trained at 50-60% of maximal exercise capacity on a treadmill for 8 weeks; NC12 and HC12 - normotensive and hypertensive controls for 12 weeks; NDT and HDT - normotensive and hypertensive trained at 50-60% of maximal exercise capacity on a treadmill for 8 weeks and detrained for 4 weeks. The resting heart rate (RHR) and SBP were measured before and after treatments, using a sensor and tail plethysmography, respectively. The total exercise time until fatigue (TTF) was determined by a maximal exercise capacity test. After treatments, the euthanasia of animals was performed by cervical dislocation followed by thoracotomy. The heart was removed, washed and cannulated via the aorta on an infusion system, and the left ventricular cardiomyocytes were isolated using enzymatic digestion (collagenase). To determine the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient, isolated cardiomyocytes from the left ventricle were incubated with the Ca^{2+} fluorescent indicator Fluo-4 acetoxymethyl ester (Fluo-4 AM) and placed inside an experimental chamber mounted on a confocal microscope. The cell contractility was determined using the technique of changing the length of cardiomyocytes using an edge detection system, with the aid of an inverted microscope. For both experiments, we used field electrical stimulation (20 V, 1 Hz, $\sim 25^\circ\text{C}$). The expression of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ regulatory proteins of the left ventricle was measured by

Western Blot, and the markers of pathologic cardiac hypertrophy by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results.** Low-intensity endurance training augmented the TTF (NC8, 11.4 ± 1.5 min vs. NT8, 22.5 ± 1.4 min; HC8, 11.7 ± 1.4 min vs. HT8, 24.5 ± 1.3 min; $P \leq 0.05$), reduced RHR (NT8_{initial}, 340 ± 8 bpm vs. NT8_{final}, 322 ± 10 bpm; HT8_{initial}, 369 ± 8 bpm vs. HT8_{final}, 344 ± 10 bpm; $P \leq 0.05$), and SBP in SHR animals (HC8, 178 ± 3 mmHg vs. HT8, 161 ± 4 mmHg; $P \leq 0.05$). HC8 rats showed a slower $[Ca^{2+}]_i$ transient (T_{peak}, 83.7 ± 1.8 ms vs. 71.7 ± 2.4 ms; T_{50%decay}, 284.0 ± 4.3 ms vs. 264.0 ± 4.1 ms; $P < 0.05$) and cell contractility (V_{shortening}, 86.1 ± 6.7 μ m/s vs. 118.6 ± 6.7 μ m/s; V_{lengthening}, 57.5 ± 7.4 μ m/s vs. 101.3 ± 7.4 μ m/s; $P \leq 0.05$), and higher expression of ANF (300%; $P \leq 0.05$), skeletal α -actin (250%; $P \leq 0.05$) and a decreased α/β -MHC ratio (70%; $P \leq 0.05$) compared to NC8. Exercise training increased $[Ca^{2+}]_i$ transient (NC8, 2.39 ± 0.06 F/F₀ vs. NT8, 2.72 ± 0.06 F/F₀; HC8, 2.28 ± 0.05 F/F₀ vs. HT8, 2.82 ± 0.05 F/F₀; $P \leq 0.05$), cell contractility (NC8, 7.4 ± 0.3 % vs. NT8, 8.4 ± 0.3 %; HC8, 6.8 ± 0.3 % vs. HT8, 7.8 ± 0.3 %; $P \leq 0.05$), and normalized the expression of ANF, skeletal α -actin, and the α/β -MHC ratio in HT8 rats. Furthermore, augmented the expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA2a) (NC8, 0.93 ± 0.15 vs. NT8, 1.49 ± 0.14 ; HC8, 0.83 ± 0.13 vs. HT8, 1.32 ± 0.14 ; $P < 0.05$), phosphorylation of phospholamban at serine 16 (PLB_{ser16}) (NC8, 0.89 ± 0.18 vs. NT8, 1.23 ± 0.17 ; HC8, 0.77 ± 0.17 vs. HT8, 1.32 ± 0.16 ; $P < 0.05$), and reduced the ratio total phospholamban (PLB_t)/SERCA2a (NC8, 1.21 ± 0.19 vs. NT8, 0.50 ± 0.21 ; HC8, 1.38 ± 0.17 vs. HT8, 0.66 ± 0.21 ; $P < 0.05$) in the left ventricle of trained animals. However, all these adaptations returned to sedentary values within 4 weeks of detraining in both SHR and normotensive animals. **Conclusion.** The low-intensity endurance training induces beneficial adaptations on the molecular and mechanical properties of isolated cardiomyocytes from the left ventricle of normotensive and hypertensive rats. Detraining for a period of 4 weeks, reversed all these benefits.

Keywords: Physical Activity; Inactivity; Hypertension; Cardiomyocyte; Calcium transient; Hypertrophy molecular markers

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Acoplamento excitação-contração e o transiente intracelular global de Ca^{2+} do coração:

O acoplamento excitação-contração (AEC) do músculo cardíaco é o processo que compreende desde a excitação elétrica dos cardiomiócitos até a contração do coração (Bers, 2002).

A capacidade contrátil dos cardiomiócitos está diretamente associada à homeostase do íon Ca^{2+} , que está envolvido tanto na excitabilidade dos cardiomiócitos, quanto no desencadeamento de eventos subcelulares, que ativarão os filamentos contráteis, provocando a contração celular (Bers, 2001; Bers, 2008).

Durante o potencial de ação cardíaco, ocorre a despolarização do sarcolema, o que provoca um influxo de Ca^{2+} para o interior dos cardiomiócitos (Fabiato & Fabiato, 1975). Esse influxo ocorre por meio da abertura de duas classes de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, os canais de Ca^{2+} do tipo L e do tipo T (Bers, 2001; Bers, 2008). Essa movimentação, gera uma corrente de entrada de Ca^{2+} (ICa) (Mitra & Morad, 1986), que nos cardiomiócitos é representada principalmente pela ICa do tipo L, uma vez que a atividade dos canais de Ca^{2+} do tipo T é baixa em cardiomiócitos ventriculares (Bers, 2002).

Os canais de Ca^{2+} do tipo L, também conhecidos como receptores de dihidropiridina (DHPR) estão expressos em sua maior parte nos túbulos transversos do sarcolema, com a sua porção intracelular voltada para o retículo sarcoplasmático (Scriven et al., 2000). Por outro lado, a maioria dos canais de Ca^{2+} do tipo T não está localizada nas regiões de junção entre o sarcolema e o retículo sarcoplasmático, o que limita sua contribuição no processo de AEC (Bers, 2002).

Dentro da organização estrutural do cardiomiócito, entre o sarcolema e a membrana do retículo sarcoplasmático, encontra-se o local denominado de subespaço (Cheng & Lederer, 2008). Na membrana do retículo sarcoplasmático, também integrando o subespaço, está a unidade liberadora de Ca^{2+} , que compreende um grupo específico de canais, denominados canais receptores de rianodina (RyR), do tipo 2 nos cardiomiócitos (RyR2) (Bers, 2001). Cada junção entre o sarcolema (túbulos transversos e superfície) e o retículo sarcoplasmático, possui cerca de 10-25 canais de Ca^{2+} tipo L e 100-200 RyR2, constituindo locais ideais para o acoplamento (Bers, 2008). Os RyR2 são estabilizados pela proteína de ligação FK506 (FKBP12.6), que em situações normais, encontra-se incorporada aos RyR2 e previne

ativações anômalas dos canais durante a fase de repouso do ciclo cardíaco (Brillantes et al., 1994).

Esse arranjo entre os DHPR e os RyR2, juntamente com o subespaço entre eles, formam o *couplon*, complexo estrutural e funcional do AEC (Cheng & Lederer, 2008). Todos esses arranjos funcionais de colocalização e formação de microdomínios de Ca^{2+} são fundamentais para a eficiência do processo de AEC (Berridge, 2006).

O influxo de Ca^{2+} através dos canais do tipo L para o subespaço, estimula a liberação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático, processo conhecido como liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (Fabiato & Fabiato, 1977; Fabiato & Fabiato, 1983). Essa liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático para o citoplasma ocorre através dos RyR2 (Nayler et al., 1970). O Ca^{2+} que entra pelos canais do tipo L, se liga a dois locais específicos nos RyR2, um de baixa afinidade onde se ligará rapidamente ativando o canal e outro de alta afinidade no qual se ligará lentamente desativando o canal (Bers, 2001). Além disso, os RyR2 também podem ser ativados através da fosforilação dos resíduos de serina 2808, 2809 e 2030 por uma proteína quinase A (PKA), por meio de uma via dependente de AMP cíclico, além da fosforilação dos resíduos de serina 2809 e 2814 por uma proteína quinase II ativada pela via da Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII) (Bers, 2001; Bers, 2006; Bers, 2008).

Essa ativação dos RyR2, aumenta a liberação fracional de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, e provoca aumentos transitórios na concentração sarcoplasmática de Ca^{2+} , que podem variar desde eventos mais discretos, como, por exemplo, as *sparks* de Ca^{2+} , que ocorrem quando há a liberação de Ca^{2+} em apenas uma unidade liberadora (Cheng et al., 1993), até eventos menos discretos, como o transiente intracelular global de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), quando ocorre a liberação sincrônica de Ca^{2+} de aproximadamente 10.000 unidades liberadoras (Cheng et al., 1993; Bers, 2001). Durante o transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, a ativação dos RyR2 pelo Ca^{2+} é suficiente para aumentar as concentrações sarcoplasmáticas deste íon, fazendo-o variar de 100 nM na diástole para até um pico de 1 μM na fase sistólica. A combinação da entrada de Ca^{2+} pelo canais do tipo L, e o efluxo de Ca^{2+} pelos RyR2, permitirá a ligação do Ca^{2+} à troponina C, o que ativará os filamentos contráteis e provocará a contração do cardiomiócito (Bers, 2001).

Para que ocorra o relaxamento do cardiomiócito, é necessário a dissociação do Ca^{2+} dos sítios de ligação com a troponina C e sua diminuição/remoção do sarcoplasma (Guatimosim et al., 2002). Essa remoção do Ca^{2+} do sarcoplasma durante o relaxamento, ocorre por meio de quatro processos que envolvem a isoforma cardíaca da Ca^{2+} ATPase do

retículo sarcoplasmático (SERCA2a), os canais trocadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), a Ca^{2+} ATPase do sarcolema e a captação mitocondrial de Ca^{2+} , sendo que esses dois últimos, conhecidos como “sistemas lentos” de remoção (Bers, 2001). A atividade da SERCA2a é o principal destes mecanismos (Tada & Katz, 1982), sendo que em cardiomiócitos de ratos, durante o relaxamento, é responsável por aproximadamente 92% da recaptação total de Ca^{2+} para o interior do retículo sarcoplasmático, além do que 7% do total de Ca^{2+} são removidos do sarcoplasma através dos NCX e 1% através dos “sistemas lentos” (Bassani et al., 1994; Bers, 2002). A atividade da SERCA2a é regulada principalmente pelo inibidor endógeno fosfolambam (FLB), que, quando está associada à SERCA2a, diminui o transporte de Ca^{2+} e a sua atividade de ATPase (Bers, 2001). Todavia, quando a FLB é fosforilada, ocorre a sua dissociação da SERCA2a e, por consequência, a remoção da inibição por duas vias principais. A primeira envolve a fosforilação do resíduo de serina 16 ($\text{FLB}_{\text{ser16}}$) pela PKA, por meio de uma via dependente de AMP cíclico (Kirchberger et al., 1974). A segunda envolve a fosforilação do resíduo de treonina 17 ($\text{FLB}_{\text{thr17}}$) por uma CaMKII (Bassani et al., 1995).

A fosforilação da FLB pela PKA (no resíduo de serina 16) e pela CaMKII (no resíduo de treonina 17), reverte a inibição da FLB sobre a SERCA2a, provocando aumento da taxa de recaptação de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático. Além disso, esse processo (principalmente a fosforilação da FLB pela PKA no resíduo de serina 16) é o principal mediador do efeito positivo sobre o inotropismo e lusitropismo cardíaco provocado pela estimulação β -adrenérgica no músculo cardíaco. O aumento da atividade da SERCA2a e da taxa de recaptação de Ca^{2+} provocadas por essas fosforilações, geram um aumento da velocidade de relaxamento celular, aumento do conteúdo de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, e consequentemente aumento da liberação de Ca^{2+} e da contratilidade miocárdica (Wegener et al., 1989; Mattiazzi et al., 2005).

A ação de bomba do coração origina-se de uma ação coordenada da contração dos cardiomiócitos, e se o volume de ejeção é alterado em função do aumento da sobrecarga de trabalho, a força e amplitude de contração de cada cardiomiócito também será alterada (Bers, 2002; Kemi & Wisloff, 2010).

Diversos trabalhos têm estabelecido relações diretas de funcionalidade entre o mecanismo de AEC em cardiomiócitos e a capacidade aeróbia (Wisloff et al., 2001; Kemi et al., 2004; Kemi et al., 2005; Wisloff et al., 2005; Kemi et al., 2007; Kemi et al., 2008; Prímola-Gomes et al., 2009). Sabe-se que a maior capacidade aeróbia está diretamente associada a adaptações positivas no transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, e na contratilidade de

cardiomiócitos, tanto em modelos de capacidade aeróbia intrínseca (Wisloff et al., 2005; Prímola-Gomes et al., 2009; Quintão-Júnior et al., 2012), quanto nos estudos envolvendo aumentos da capacidade aeróbia por meio de treinamento físico (Wisloff et al., 2001; Kemi et al., 2004; Kemi et al., 2005; Kemi et al., 2007; Kemi et al., 2008a).

Uma das características centrais do treinamento físico regular é a melhoria da função sistólica e diastólica do coração (Ferguson et al., 2001), sendo que a maioria das adaptações crônicas no AEC do coração induzidas pelo treinamento físico, são originadas das adaptações celulares e subcelulares observadas nos cardiomiócitos isolados (Diffie, 2004, Kemi et al., 2008b, Kemi & Wisloff, 2010). Todavia, os efeitos do treinamento físico sobre o AEC em cardiomiócitos, durante o processo hipertensivo, são pouco conhecidos.

1.2 – Hipertensão arterial, treinamento físico e destreinamento: relações com o acoplamento excitação-contração e o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ do coração:

A hipertensão arterial é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial sanguínea. Tem alta prevalência e baixas taxas de controle, sendo considerada um dos principais fatores de risco modificáveis e um dos mais importantes problemas de saúde pública (Chobanian et al., 2003; Williams, 2009; SBC, 2010).

Em 2001, cerca de 7,6 milhões de mortes no mundo foram atribuídas à elevação da pressão arterial, sendo que 54% por acidente vascular encefálico e 46% por doença isquêmica do coração. A maioria desses eventos ocorreu em países de baixo e médio desenvolvimento econômico, e mais da metade em indivíduos entre 45 e 69 anos (Williams, 2009; SBC, 2010).

Em um trabalho sistemático quantitativo de 2003 a 2008, englobando 44 estudos em 35 países, foi identificada uma prevalência global de hipertensão arterial de 37,8% em homens e 32,1% em mulheres (Pereira et al., 2009). No Brasil, estudos populacionais nos últimos anos apontam uma prevalência de hipertensão arterial acima de 30%, sendo 35,8% na população masculina e 30% na feminina (SBC, 2010); achados semelhantes à de outros países (Pereira et al., 2009).

A hipertensão arterial está associada a alterações metabólicas gerais, e ao remodelamento funcional e estrutural de órgãos como coração, encéfalo e rins, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais, sendo considerada um dos principais precursores da insuficiência cardíaca (Vasan et al., 2001; Chobanian et al., 2003; SBC, 2010).

Os estudos sobre a fisiopatologia da hipertensão arterial foram ampliados pelo uso de modelos experimentais de hipertensão. É comum a utilização de modelos animais para a investigação e compreensão dos efeitos da hipertensão arterial sobre determinados parâmetros fisiológicos que apresentam limitações para serem analisados em seres humanos.

O rato espontaneamente hipertenso (SHR – *Spontaneously Hypertensive Rat*) é um dos modelos de hipertensão arterial utilizado para investigações, desenvolvido por Okamoto e Aoki (1963). Esse modelo apresenta algumas vantagens por imitar a hipertensão humana seguindo progressão semelhante, com a fase de pré-hipertensão, desenvolvimento e hipertensão sustentada por várias semanas. É caracterizado pela presença de sintomas previsíveis e controláveis, além de permitir a análise de parâmetros cardiovasculares relevantes (Trippodo & Frohlich, 1981; Doggrell & Brown, 1998). A fase de hipertensão arterial/hipertrofia cardíaca compensada do SHR inicia-se por volta do 3º mês de idade, enquanto que o início da insuficiência cardíaca ocorre por volta do 18º-24º mês (Hasenfuss, 1998; Doggrell & Brown, 1998).

A hipertensão arterial provoca hipertrofia cardíaca concêntrica patológica, aumento da espessura da parede ventricular e redução da câmara cardíaca, reexpressão de genes fetais [ex: fator natriurético atrial (FNA), α -actina esquelética e a β -miosina de cadeia pesada (β -MCP)], aumento do conteúdo de colágeno com diminuição da complacência ventricular, redução da densidade capilar, apoptose e disfunções cardíacas, sendo considerada um dos principais fatores de risco cardiovascular e um dos sinais de mau prognóstico, associada com quase todas as formas de insuficiência cardíaca (Levy et al., 1990; McMullen & Jennings, 2007; Kolwicz et al., 2009; Bernardo et al., 2010).

Por outro lado, a hipertrofia cardíaca provocada pelo exercício físico é considerada fisiológica, caracterizada pela organização normal da estrutura do coração, com aumento proporcional da espessura da parede ventricular e da dimensão da câmara cardíaca, melhoria da função cardíaca, aumento da capilarização, redução do conteúdo de colágeno, sem presença de fibrose e/ou apoptose (McMullen & Jennings, 2007; Bernardo et al., 2010; Ellison et al., 2012). Especificamente, o treinamento físico do tipo aeróbio (ex: corrida, natação, ciclismo, etc.), pode aumentar a complacência ventricular, o volume diastólico final, reduzir a pós-carga e melhorar a produção de tensão pelo músculo cardíaco, indicando que também melhora a função contrátil cardíaca intrínseca (Diffie, 2004; Bernardo et al., 2010; Kemi & Wisloff, 2010; Ellison et al., 2012). O remodelamento cardíaco induzido pelo exercício físico é fundamental por melhorar a capacidade do sistema cardiovascular em

atender as demandas metabólicas da musculatura esquelética, sendo que a principal resposta adaptativa que contribui para o maior débito cardíaco observado em indivíduos treinados é o aumento no volume de ejeção (Gledhill et al., 1994; Rowland, 2009; Weiner & Baggish, 2012).

A duração do estímulo é considerada fundamental na determinação da resposta fenotípica hipertrófica apresentada pelo músculo cardíaco, uma vez que o estímulo para a hipertrofia cardíaca patológica é crônico (ex: hipertensão arterial), enquanto que o para a hipertrofia cardíaca fisiológica é intermitente (ex: exercício físico) (Bernardo et al., 2010; Weeks & McMullen, 2011).

A hipertensão arterial provoca alterações no funcionamento cardíaco, sendo que anormalidades elétricas e mecânicas já foram relatadas em cardiomiócitos ventriculares de ratos SHR (Boluyt et al., 1995; Evans et al., 1995; Shorofsky et al., 1999; Roman-Campos et al., 2012). Em nível celular, na fase de hipertensão arterial/hipertrofia cardíaca compensada em ratos SHR, foi mostrado que amplitude de contração de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo aumenta, enquanto que a duração do potencial de ação, o tempo do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, e os tempos de contração e relaxamento celular estão prolongados (Brooksby et al., 1992; McGrossan et al., 2004; Roman-Campos et al., 2012). Uma das explicações para tais achados, seria a diminuição da densidade da corrente repolarizante transitória de efluxo de K^+ (Ito) encontrada em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de ratos SHR, o que prolongaria a duração do potencial de ação nessas células (Benitah et al., 1993; Hart, 1994; Roman-Campos et al., 2012). Essas alterações poderiam expor o coração hipertenso a eventos arrítmicos (Evans et al., 1995). Por outro lado, com relação às proteínas reguladoras do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e moduladoras do ciclo contração-relaxamento, não foram encontradas diferenças na expressão da fosfolambam total (FLBt), FLB_{ser16} , SERCA2a e RyR2 no ventrículo esquerdo de animais normotensos e SHR (Shorofsky et al., 1999; MacDonell et al., 2005; Kolwicz et al., 2007; Garcarena et al., 2009), enquanto alguns trabalhos demonstraram aumento da expressão dos NCX no ventrículo esquerdo associada à hipertensão arterial (Collins et al., 2005; MacDonell et al., 2005; Garcarena et al., 2009).

Dados epidemiológicos mostram que a prática de atividade física se correlaciona inversamente com a mortalidade por doença cardíaca (Vasan et al., 2001; Pescatello et al., 2004). Nesse contexto, considerando-se que a hipertensão arterial é fator de risco para tais doenças, o exercício físico tem sido indicado como um tratamento anti-hipertensivo, não farmacológico.

Um estilo de vida saudável, associado com a terapia anti-hipertensiva, é recomendado e indispensável para o controle adequado dos níveis da pressão arterial, sendo o exercício físico um componente essencial desses hábitos de vida (Chobanian et al., 2003; Pescatello et al., 2004). Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que o exercício físico aeróbio provoca efeitos benéficos sobre os valores de pressão arterial e melhora a qualidade de vida de indivíduos hipertensos e normotensos (Miyai et al., 2002; Whelton et al., 2002; Tsai et al., 2004; Sun et al., 2008; Cornelissen & Smart, 2013). De forma geral, para indivíduos hipertensos, recomenda-se que a intensidade de exercício físico mais efetiva e segura seja de leve a moderada, entre 40-60% do volume máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$) de reserva e/ou da frequência cardíaca máxima ($FC_{máx}$) de reserva, preferencialmente todos os dias da semana, com duração mínima diária de 30 minutos de atividades aeróbias que podem ser suplementadas por atividades de resistência muscular (Pescatello et al., 2004; Sharman & Stowasser, 2009; SBC, 2010).

Os mecanismos responsáveis pela diminuição da pressão arterial em resposta ao exercício físico aeróbio incluem adaptações estruturais, vasculares e neuro-humorais, como: diminuição da adiposidade, dos níveis plasmáticos de catecolaminas (ex: adrenalina e noradrenalina) e da resistência periférica total; aumento da sensibilidade à insulina e da sensibilidade barorreflexa de artérias e arteríolas; aumento da produção de substâncias vasodilatadoras (ex: óxido nítrico) e diminuição da produção de substâncias vasoconstritoras (ex: renina e angiotensina II) (Pescatello et al., 2004; Hamer et al., 2006). Todos esses benefícios provocados pelo exercício físico aeróbio sobre a diminuição da pressão arterial são acompanhados por uma melhora fenotípica global do miocárdio e por uma regressão do remodelamento estrutural e funcional do sistema cardiovascular que ocorre em função do processo hipertensivo (Garciaarena et al., 2009; Kolwicz et al., 2009; Libonati et al., 2011).

Os efeitos do exercício físico sobre a progressão da hipertensão arterial e o desenvolvimento da insuficiência cardíaca têm sido estudados em animais SHR (Schlüter et al., 2010). Já foi relatado na literatura que o treinamento físico com corrida de intensidade baixa a moderada melhorou o desempenho inotrópico, a responsividade β -adrenérgica, aumentou a fosforilação de proteínas reguladoras do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ como os RyR2 e a FLB, e atenuou disfunções sistólicas no miocárdio de ratas SHR, durante a fase compensada da hipertrofia induzida pela hipertensão arterial (MacDonell et al., 2005; Kolwicz et al., 2007; Libonati et al., 2011). O treinamento físico com natação de intensidade baixa a moderada aumentou a fração de encurtamento ventricular, a densidade capilar e diminuiu o conteúdo de

colágeno do miocárdio de ratos SHR (Garciaarena et al., 2009). Além disso, também já foi mostrado que o treinamento com corrida de baixa intensidade diminuiu a apoptose e aumentou o número de células cardíacas progenitoras no coração de ratas SHR (Kolwicz, 2009). Os achados descritos acima suportam a ideia de que o treinamento físico aeróbio altera o modelo de remodelamento patológico do miocárdio presente durante o processo hipertensivo, caracterizado por disfunções estruturais e funcionais, para um modelo de remodelamento fisiológico, que melhora a estrutura e o desempenho miocárdico.

Em nível celular, trabalhos desenvolvidos por nosso grupo e por outros já demonstraram que a capacidade para o exercício físico está relacionada ao transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e à contratilidade em cardiomiócitos ventriculares isolados (Wisloff et al., 2005; Prímola-Gomes et al. 2009; Quintão-Júnior et al., 2012), e que o treinamento físico aeróbio melhorou a função de cardiomiócitos isolados em ratas normotensas (Wisloff et al., 2001; Natali et al., 2002; Kemi et al., 2004; Kemi et al., 2005; Kemi et al., 2007; Kemi et al., 2008a) e em ratos SHR (Carneiro-Júnior et al., 2010; Roman-Campos et al., 2012).

Foi mostrado que o treinamento físico aeróbio intervalado de alta intensidade, aumentou a sensibilidade ao Ca^{2+} e a amplitude de contração celular, diminuiu o tempo de duração do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e do ciclo contração-relaxamento de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de ratas, sendo que essas adaptações foram relacionadas com modificações na expressão de proteínas reguladoras do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, como aumento da expressão da SERCA2a (Wisloff et al., 2001; Kemi et al., 2007; Kemi et al., 2008a), fosforilação da FLB_{thr17} (Kemi et al., 2007), sem alteração na expressão dos níveis da FLBt (Kemi et al., 2007; Kemi et al., 2008a). Todas essas adaptações celulares em resposta ao exercício físico podem contribuir para a melhoria da função cardíaca global. Todavia, os efeitos do treinamento físico aeróbio de baixa intensidade sobre o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e a expressão de proteínas reguladoras do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em corações de ratos expostos à sobrecarga provocada pela hipertensão não são conhecidos.

A ciência do treinamento esportivo apresenta de acordo com o princípio da reversibilidade, que o exercício físico regular provoca várias adaptações morfofisiológicas que melhoram o desempenho, todavia, a interrupção ou a redução significativa do treinamento físico conduz a uma reversão parcial ou até mesmo completa dessas adaptações. O destreinamento pode ser definido como a perda parcial ou total das adaptações morfológicas, fisiológicas e do desempenho provocado pelo treinamento físico, como consequência da

redução significativa das atividades ou da inatividade (Mujika & Padilla, 2001a; Mujika & Padilla, 2001b).

Dessa forma, os efeitos do treinamento físico sobre o sistema cardiovascular, inclusive sobre o coração, são reversíveis com o destreino. De fato, alguns estudos já mostraram que atletas apresentaram regressão de hipertrofia ventricular após períodos de destreino (Giada et al., 1998; Pellicia et al., 2002). Em animais, Craig et al. (1991) relataram que a hipertrofia cardíaca observada em ratas submetidas ao treinamento com natação, foi revertida aos níveis basais, após um período de 3 semanas de destreino. A bradicardia de repouso induzida pelo treinamento físico aeróbio, uma adaptação clássica do miocárdio de indivíduos treinados aerobiamente, foi revertida após 2 semanas de destreino em ratos normotensos treinados (Evangelista et al., 2005). A melhora da função inotrópica e lusitropica de músculos papilares de ratas treinadas em natação, foi revertida após 2 semanas de destreino (Bocalini et al., 2010).

Em nível celular, o destreino reverteu o aumento da contratilidade de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de ratas normotensas (Kemi et al., 2004) e de ratos SHR (Carneiro-Júnior et al., 2010), embora os mecanismos responsáveis por esses achados nos animais hipertensos, não tenham sido esclarecidos. A melhora da capacidade aeróbia de ratas normotensas foi intimamente associada com o aumento da contratilidade celular e o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo durante o período de treinamento intervalado com corrida em esteira de alta intensidade (2-13 semanas), sendo que todas essas adaptações foram revertidas após o período de destreino (2-4 semanas) (Kemi et al., 2004). Entretanto, até o momento, os efeitos do treinamento físico aeróbio de baixa intensidade e do destreino, sobre a capacidade física, o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e a expressão de proteínas reguladoras do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ no ventrículo esquerdo de ratos normotensos e hipertensos, não foram investigados.

Uma vez que o treinamento físico aeróbio de intensidade baixa a moderada é recomendado como componente essencial e permanente do programa de controle da pressão arterial em indivíduos hipertensos (Chobanian et al., 2003; Pescatello et al., 2004), nosso principal objetivo foi determinar os efeitos do treinamento físico aeróbio de baixa intensidade e do destreino sobre as propriedades moleculares e mecânicas de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de ratos normotensos, e hipertensos na fase compensada da hipertensão arterial/hipertrofia cardíaca. Esses dados podem fornecer novas informações sobre as adaptações celulares e subcelulares em resposta ao treinamento físico, sobre o

comportamento dessas adaptações após o período de destreinamento, e destacar a importância da manutenção de um estilo de vida fisicamente ativo.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral:

Investigar os efeitos do treinamento físico aeróbio de baixa intensidade e do destreinamento sobre parâmetros cardiovasculares e sobre propriedades moleculares e mecânicas de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de ratos normotensos e hipertensos.

2.2- Objetivos Específicos:

Investigar se um programa de corrida em esteira de baixa intensidade, seguido de um período de destreinamento alteram em ratos normotensos e hipertensos:

- A pressão arterial sistólica (PAS) e a frequência cardíaca de repouso (FCR);
- A amplitude e a duração das fases sistólica e diastólica do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo;
- A amplitude de contração e as velocidades de contração e de relaxamento de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo;
- A expressão das proteínas reguladoras do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (FLBt, FLB_{ser16}, SERCA2a, NCX) no ventrículo esquerdo;
- A expressão de genes marcadores de hipertrofia cardíaca patológica (α -actina esquelética, FNA, razão α -MCP/ β -MCP) no ventrículo esquerdo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1 - Animais de experimentação e tratamentos:

Foram utilizados 32 ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar e 32 ratos espontaneamente hipertensos (SHR - *Spontaneously Hypertensive Rats*), com 16 semanas de idade. Os animais foram obtidos no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa - MG. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto recebeu aprovação da Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (processo nº 48/2011) (Anexos).

Os animais foram alojados em gaiolas coletivas (4 animais por gaiola), receberam água e ração comercial *ad libitum* sendo mantidos em ambiente com temperatura média de 22°C e regime de luminosidade de doze horas de escuridão e doze horas de claridade. Os animais foram pesados no primeiro dia de cada semana do período experimental, utilizando-se uma balança eletrônica digital (Marte – Brasil, modelo AS5500C).

Os animais foram aleatoriamente separados em 8 grupos, com 8 animais em cada grupo, conforme a seguir:

- NC8 (normotenso controle por 8 semanas): ratos normotensos controles que não foram submetidos ao treinamento com corrida em esteira por 8 semanas;
- HC8 (hipertenso controle por 8 semanas): ratos hipertensos controles que não foram submetidos ao treinamento com corrida em esteira por 8 semanas;
- NT8 (normotenso treinado por 8 semanas): ratos normotensos que foram submetidos ao treinamento com corrida em esteira por 8 semanas;
- HT8 (hipertenso treinado por 8 semanas): ratos hipertensos que foram submetidos ao treinamento com corrida em esteira por 8 semanas;
- NC12 (normotenso controle por 12 semanas): ratos normotensos controles que não foram submetidos ao treinamento com corrida em esteira por 12 semanas;
- HC12 (hipertenso controle por 12 semanas): ratos hipertensos controles que não foram submetidos ao treinamento com corrida em esteira por 12 semanas;
- NDT (normotenso treinado por 8 e destreinado por 4 semanas): ratos normotensos que foram submetidos ao treinamento com corrida em esteira por 8 semanas e logo após, permaneceram 4 semanas sem treinamento;

- HDT (hipertenso treinado por 8 e destreinado por 4 semanas): ratos hipertensos que foram submetidos ao treinamento com corrida em esteira por 8 semanas e logo após, permaneceram 4 semanas sem treinamento.

3.2 - Programa de treinamento físico e destreinamento:

O programa de treinamento físico com corrida foi realizado em uma esteira rolante (Insight Instrumentos – Ribeirão Preto, SP, Brasil), 5 dias por semana, 1 hora por dia, durante 8 semanas, no Laboratório de Biologia do Exercício do Departamento de Educação Física da Universidade Federal de Viçosa.

Antes do início do treinamento físico, todos os animais foram colocados na esteira rolante para adaptação, durante 10 min/dia, 0° de inclinação, 0,3 km/h, durante 5 dias. Após 48 horas, foi realizado o teste na esteira rolante para determinação da velocidade máxima de corrida (VMC), começando a 0,3 km/h, 0° de inclinação, com incrementos de 0,18 km/h a cada 3 minutos até a fadiga de cada animal de todos os grupos experimentais. O momento da fadiga foi definido e o teste interrompido quando os animais não mantiveram a corrida de acordo com a velocidade da esteira. A intensidade do protocolo de treinamento foi monitorada através do aumento progressivo do tempo e da velocidade de corrida, atingindo 1 hora/dia, 0° de inclinação e 50 a 60% da média da VMC dos animais dos grupos NT8, HT8, NDT e HDT a partir da 3ª semana de treinamento até o final da 8ª semana (adaptado de Melo et al. 2003; Moraes-Silva et al. 2010).

Os animais iniciaram o programa de exercício correndo à intensidade de 50% da VMC (~ 0,5 a 0,6 km/h), 0° de inclinação e 10 minutos no primeiro dia. Na primeira semana, a duração foi aumentada em 5 minutos por dia e a intensidade foi mantida em 50% da VMC. Na segunda semana, a duração continuou sendo aumentada em 5 minutos e a intensidade em 2% da VMC por dia, de maneira que a partir do primeiro dia da 3ª até o final da 4ª semana, os animais correram a uma intensidade de 50 a 60% (~ 0,6 a 0,7 km/h) da VMC durante 60 minutos.

Os testes na esteira rolante para determinação da VMC foram realizados em cada animal de todos os grupos experimentais antes dos tratamentos, e no final da 4ª semana nos animais dos grupos treinados (NT8, HT8, NDT e HDT) para avaliação do tempo total de exercício até a fadiga (TTF) e redefinição da intensidade (velocidade de corrida ~ 0,8 a 0,9 km/h).

Quarenta e oito horas após a última sessão de treino, os testes foram repetidos em todos os animais dos grupos experimentais para avaliação dos efeitos do treinamento físico por 8 semanas sobre a capacidade de corrida (TTF), e após a 4ª semana de destreinamento nos animais dos grupos NC12, NDT, HC12 e HDT que permaneceram em suas gaiolas, sem treinamento, nesse período.

Durante o período experimental, os animais dos grupos controles NC8, NC12, HC8 e HC12 foram manuseados identicamente, e colocados na esteira rolante 3 dias/semana, 10 min/dia, 0° de inclinação a 0,3 km/h. Esse procedimento foi realizado com os animais dos grupos controles com o objetivo de expor todos às mesmas condições experimentais, sendo que a duração e intensidade utilizadas, são insuficientes para provocar adaptações (Baldwin, 1977).

3.3 - Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Frequência Cardíaca de Repouso (FCR):

A aferição da PAS e da FCR de todos os animais foi realizada no início e quarenta e oito horas após o final de cada período experimental por meio de sistemas não invasivos, sem utilização de nenhum método anestésico. Por um período de cinco dias antes da realização das medidas cardiovasculares, todos os ratos foram aclimatados aos aparatos e às condições utilizadas para as medidas da PAS e da FCR, durante sessões diárias. Os registros da PAS e da FCR foram realizados em dias diferentes, sempre no mesmo horário do dia, em sala específica, ambiente calmo, com temperatura e luminosidade devidamente controladas, sem influência de nenhum agente externo.

A medida da PAS foi realizada por método não invasivo através de pletismografia de cauda, com a utilização de pletismógrafo devidamente calibrado e apropriado para medidas em ratos (LE 5001, Panlab, Harvard Apparatus, Espanha). Para a medida da PAS, cada rato foi colocado em um dispositivo de contenção com aeração constante, e aquecido a 29-32°C durante 10 minutos, para que ocorresse a vasodilatação do animal. O manguito de pressão e o transdutor de pulso foram colocados aproximadamente 2-3 cm da ponta da cauda, onde o tecido possui menos massa muscular e a sensibilidade de pulso é maior. Regulou-se o ganho de precisão do transdutor de pulso até o nível adequado, sendo que o manguito foi acionado e se inflou até ocluir a passagem de sangue pela artéria da cauda e o sinal de pulso desaparecer. A seguir, o manguito começou a desinflar, sendo que a PAS foi determinada a partir do momento da recaptção do sinal de pulso. Durante as avaliações, foram realizadas três medidas da PAS para cada rato, sendo considerada para registro a de valor intermediário.

A medida da FCR foi realizada por método indireto, sendo que cada rato foi colocado em um dispositivo de contenção com aeração constante, sendo que um sensor para captura do sinal da FCR foi colocado na cauda do animal. Cada rato foi mantido com o sensor por um período de aproximadamente 20 a 25 minutos, até que o sinal da FCR atingisse um estado constante de equilíbrio. Esse sinal foi captado e processado pelo sistema (PowerLab 4/30, LabChart /ADInstruments, EUA).

3.4 - Isolamento dos cardiomiócitos:

O isolamento dos cardiomiócitos foi realizado de acordo com os procedimentos descritos por Natali et al. (2001). A eutanásia de cada animal dos grupos experimentais foi realizada por deslocamento cervical, quarenta e oito horas após o final de cada tratamento.

Após a eutanásia, o coração foi removido através de toracotomia, e lavado em solução contendo 750 μM de CaCl_2 para retirar o excesso de sangue, imediatamente antes da perfusão das soluções de isolamento. A seguir, a aorta ascendente foi fixada com um fio de sutura em uma agulha de aço inoxidável modificada (cânula), e o coração isolado foi colocado em um sistema de perfusão (*Langendorff* adaptado) e perfundido com a solução de isolamento, contendo 750 μM de CaCl_2 (solução A, item 3.5), em um fluxo constante até que os vasos coronários estivessem limpos. Em seguida, trocou-se a perfusão para a solução livre de Ca^{2+} contendo 0,1 mM de ácido tetracético etilenoglicol (EGTA) (solução B, item 3.5), durante 6 minutos, para o rompimento dos discos intercalares entre os cardiomiócitos e quelação do Ca^{2+} . Por fim, o coração foi perfundido com a solução contendo 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de colagenase tipo 2 (Worthington, EUA) e 100 μM de CaCl_2 (solução C, item 3.5) durante 25 minutos, para a digestão das fibras colágenas extracelulares. Todas as soluções utilizadas no procedimento de isolamento foram oxigenadas (O_2 100% – White Martins, Brasil) e mantidas em temperatura de 35-37°C.

Após a perfusão, os ventrículos (direito e esquerdo) foram separados dos átrios e pesados em balança de precisão (Gehaka – Brasil, modelo AG 200). O ventrículo direito foi removido e o ventrículo esquerdo foi aberto na região do septo interventricular. Os músculos papilares e o tecido conjuntivo foram removidos manualmente da superfície do ventrículo esquerdo. Os índices de hipertrofia ventricular foram calculados pela razão do peso do ventrículo direito e esquerdo, respectivamente, pelo peso corporal de cada animal.

As amostras do ventrículo esquerdo foram colocadas em frascos identificados contendo 5 ml da solução enzimática (colagenase) suplementada com 1% de albumina sérica bovina (solução D, item 3.5). Os frascos foram agitados moderadamente durante 5 minutos, em “banho-maria” à temperatura de 37°C, sendo o tecido cardíaco oxigenado (O₂ 100% – White Martins, Brasil). A seguir, o conteúdo dos frascos foi filtrado e centrifugado (3000 rpm) por 30 segundos. O sobrenadante foi removido e os cardiomiócitos foram suspensos na solução 750 µM de CaCl₂ (solução A, item 3.5). Esse processo foi repetido. Os cardiomiócitos foram armazenados em placas de Petri em refrigerador (5°C) até serem utilizados.

3.5 - Soluções de isolamento:

As soluções utilizadas para o isolamento dos cardiomiócitos foram feitas usando-se uma solução básica com água deionizada ultrapura (Milli-Q) e a seguinte composição (em mM): NaCl (130) – 7,6 g/l; MgCl₂ (1,43) – 0,28 g/l; KCl (5,4) – 0,4 g/l; ácido etanosulfônico-hidroxi-etil piperazina (HEPES) (5) – 0,062 g/l; glicose (10) – 1,8 g/l; taurina (20) – 2,38 g/l; creatina (10) – 1,3 g/l; pH = 7,3; temperatura ambiente.

Solução A:

Para se fazer a solução de isolamento contendo Ca²⁺, foram adicionados 375 µl de CaCl₂ (1 M) em 500 ml da solução básica.

Solução B:

Para a solução de isolamento livre de Ca²⁺, foram adicionados 250 µl de EGTA (100 mM) em 250 ml da solução básica.

Solução C:

Para a solução enzimática de isolamento, foram adicionados 20 mg de colagenase e 15 µl de CaCl₂ (100 mM) em 20 ml da solução básica.

Solução D:

Para a solução com 1% de albumina bovina, foram adicionados 500 mg de albumina sérica bovina em 5 ml de solução básica. Após o isolamento, 1 ml de albumina foi adicionado para cada 10 ml da solução enzimática C.

3.6 - Solução de perfusão tampão HEPES:

Durante as análises da contratilidade celular e transiente de $[Ca^{2+}]_i$, os cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo foram banhados com uma solução fisiológica contendo (em mM): solução estoque: NaCl (113) – 65,99 g/l; HEPES (5) – 11,9 g/l; NaH_2PO_4 (1) – 1,42 g/l; $MgSO_4$ (1) – 2,46 g/l; KCl (5) – 3,72 g/l; solução sopa: Na acetato (20) – 16,4 g/100 ml; glicose (10) – 18,1 g/100 ml; insulina (5 u/l) – 0,5 g/100 ml. Para fazer um litro da solução de perfusão tampão HEPES, foram adicionados 100 ml da solução estoque, 10 ml da solução sopa e 1 ml de $CaCl_2$ (1) em água deionizada ultrapura (Milli-Q). Esta solução foi equilibrada para um pH = 7,4 e mantida em temperatura ambiente.

3.7 - Contratilidade celular:

As contrações dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo foram medidas através da técnica de alteração do comprimento dos cardiomiócitos usando-se o sistema de detecção de bordas (Ionoptix, EUA) montado num microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, EUA) equipado com uma lente objetiva de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, EUA), conforme descrito por Roman-Campos et al. (2009). Os cardiomiócitos isolados foram acomodados em uma câmara experimental giratória com a base de vidro montada no microscópio, e banhados pela solução de perfusão tampão HEPES (item 3.6) em temperatura ambiente ($\sim 25^\circ C$). Foram visualizados em um monitor através de uma câmera (Myocam, Ionoptix, EUA) acoplada ao microscópio invertido, utilizando-se um programa de detecção de imagens (Ionwizard, Ionoptix, EUA) com uma frequência de 240 Hz.

Os cardiomiócitos foram estimulados externamente à frequência de 1 Hz (20 V, duração de 5 ms) utilizando-se um par de eletrodos de aço, acoplado nos dois lados internos da câmara, através de um estimulador elétrico (Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix, EUA).

As bordas dos cardiomiócitos foram identificadas com duas janelas (direita e esquerda) e definidas através do ajuste do contraste (preto e branco) gerado pela qualidade da imagem projetada dos cardiomiócitos. As contrações dos cardiomiócitos após a estimulação elétrica foram capturadas pelo sistema de detecção de bordas (Ionwizard, Ionoptix, EUA) e armazenadas para análise posterior (Figura 1).

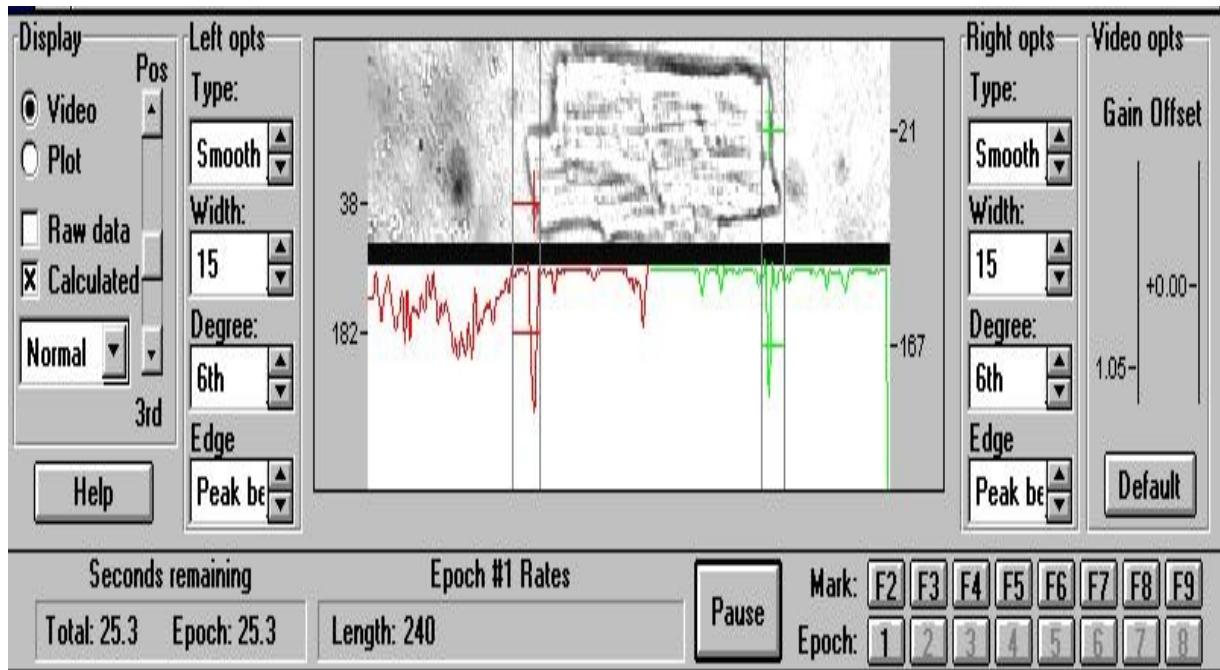


Figura 1. Representação do programa utilizado para aquisição das imagens e dos registros das contrações dos cardiomiócitos isolados. A definição das bordas direita e esquerda é projetada através dos picos verde e vermelho, respectivamente.

Somente foram utilizados para os experimentos, os cardiomiócitos que estavam em boas condições, com as bordas (direita e esquerda) e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso, sem apresentar contrações involuntárias. Os registros foram sempre feitos até quatro horas após o isolamento dos cardiomiócitos e na temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$).

A partir dos registros obtidos, foram analisadas a amplitude de contração (variação do comprimento celular de repouso, %), a velocidade máxima de contração (velocidade pico de encurtamento celular, $\mu\text{m}/\text{seg}$) e a velocidade máxima de relaxamento (velocidade pico de relaxamento celular, $\mu\text{m}/\text{seg}$). Esses parâmetros foram determinados utilizando um software desenvolvido em plataforma MatLab[®], pelo professor do curso de Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Viçosa, Dr. Leonardo Bonato Félix. Os principais parâmetros avaliados são demonstrados na Figura 2. Durante cada dia de experimento de contratilidade celular, foram analisados cardiomiócitos isolados de animais de um determinado grupo experimental e do seu respectivo grupo controle.

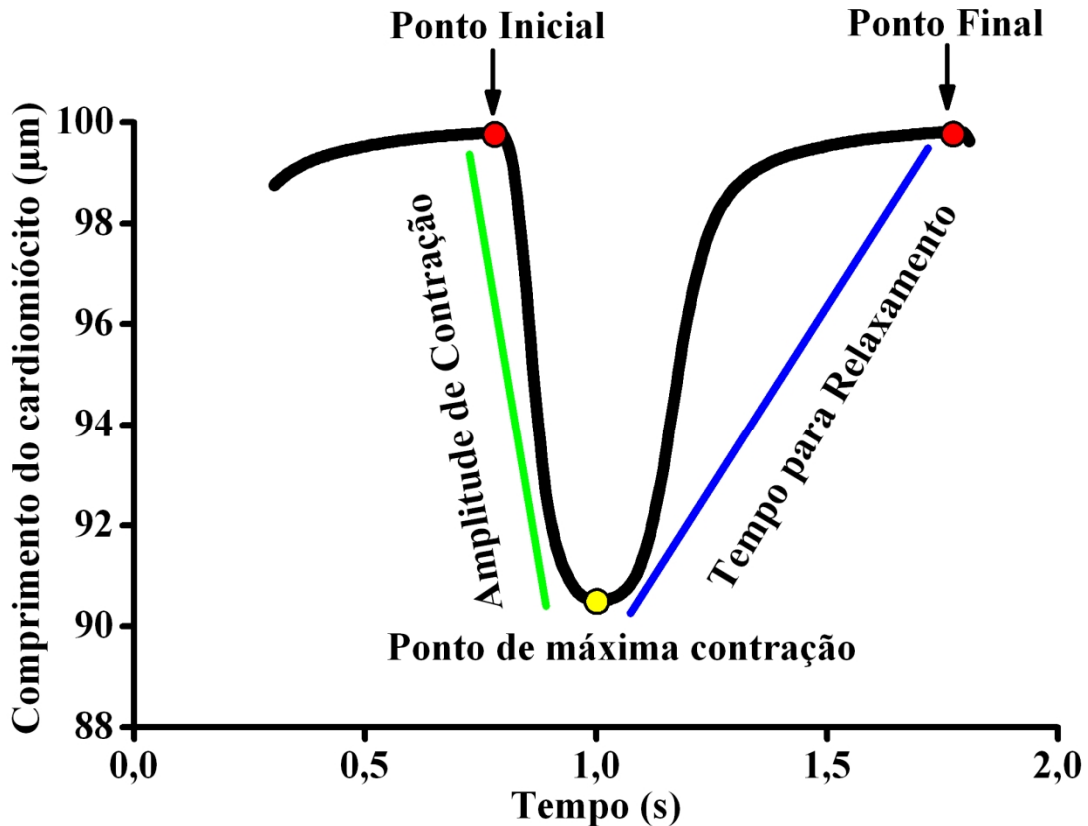


Figura 2. Traçado representativo de uma contração celular estimulada na frequência de 1 Hz, e os parâmetros avaliados.

3.8 - Medidas do transiente de $[Ca^{2+}]_i$:

As medidas do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo foram realizadas através de um microscópio de varredura a laser confocal (LSM 510 Meta, Zeiss GmbH, Alemanha) equipado com uma lente objetiva de imersão em óleo (Plan-Apo/1.4, 63x, Zeiss, Alemanha). Os cardiomiócitos foram incubados com o indicador fluorescente de Ca^{2+} , permeável à membrana plasmática, Fluo-4 acetoximetil-éster (Fluo-4 AM, Molecular Probes, Eugene, EUA), conforme descrito por Prímola-Gomes et al. (2009).

O Fluo-4 AM (5 μ M) foi preparado em uma solução de estoque a base de dimetil-sulfóxido – DMSO (30 μ l de DMSO em 50 μ g de Fluo-4 AM). Adicionou-se 5 μ l dessa solução de Fluo-4 AM/DMSO em 495 μ l de meio celular, durante 20 min à temperatura ambiente. Após esse procedimento, os cardiomiócitos foram lavados e suspensos em solução tampão HEPES (item 3.6) para remover o excesso da sonda fluorescente, acomodados em uma câmara experimental giratória com a base de vidro e banhados pela solução de perfusão tampão HEPES (item 3.6) à temperatura ambiente ($\sim 25^\circ$ C). Quando esta

sonda está ligada ao Ca^{2+} e é excitada com o comprimento de onda de 488 nm, emite um sinal de fluorescência medido a 510 nm, que se relaciona às variações sarcoplasmáticas de Ca^{2+} . Tais variações foram expressas em relação à razão: F/F_0 . Nas medidas dos transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, F representa a média da fluorescência máxima após os estímulos, na fase sistólica do transiente, e F_0 representa a média da fluorescência mínima medida entre as contrações celulares, na fase diastólica do transiente.

Os transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ foram evocados por meio de estimulação de campo. Os cardiomiócitos foram estimulados eletricamente (Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix, EUA) por um par de eletrodos de platina acoplado nos dois lados internos da câmara, com um pulso supra-limiar de 0,2 ms e 20 V (*voltage square pulse*), na frequência de 1 Hz para produzir condições estacionárias. Os sinais de fluorescência foram obtidos por meio de varredura em linha (*Line Scan Mode*). A linha de varredura (512 *pixels*) foi posicionada aleatoriamente no eixo longitudinal da célula, com o cuidado de não cruzar regiões de núcleos. As varreduras foram feitas por meio de um laser de argônio (488 nm). As varreduras foram repetidas a cada 1,54 ms, sendo utilizadas para a criação de imagens bidimensionais (tempo no eixo x e fluorescência no eixo y) (Figura 3).

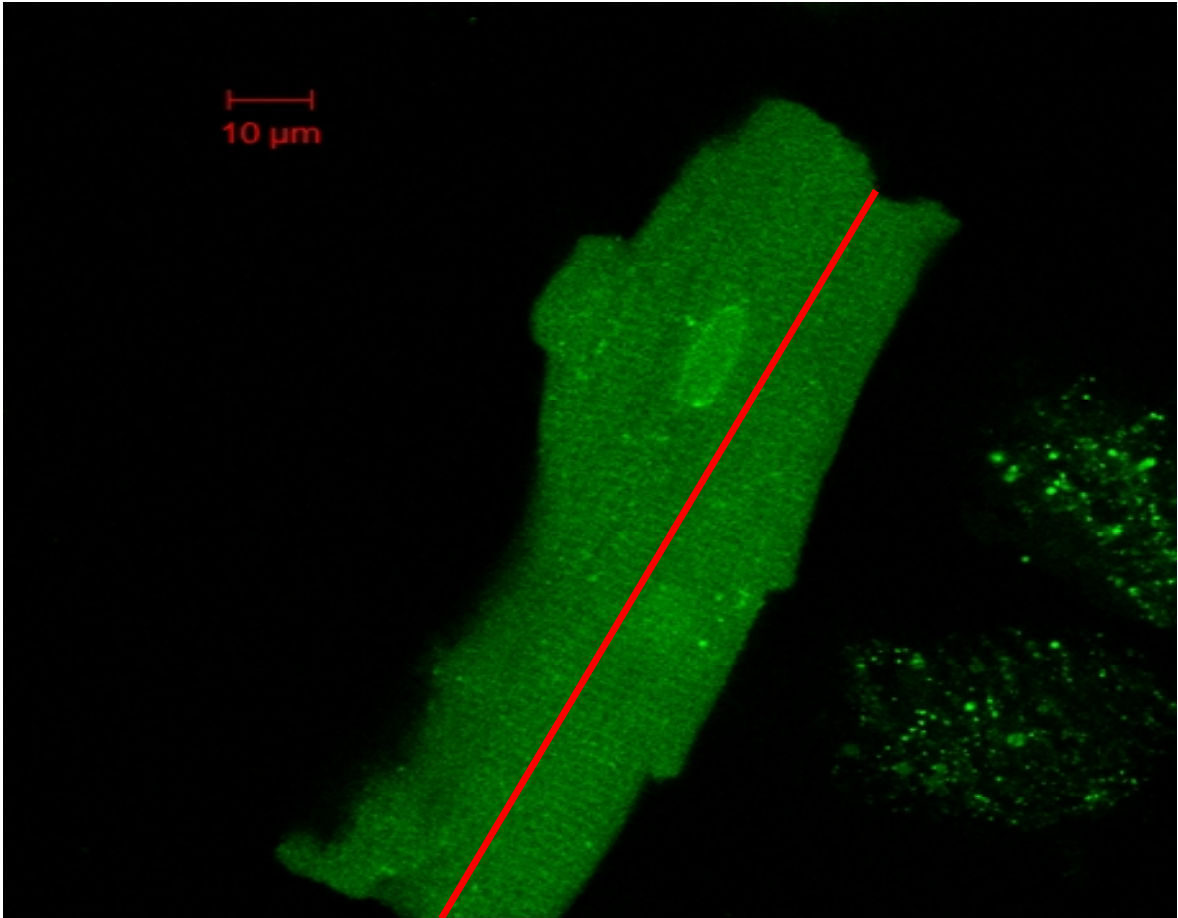


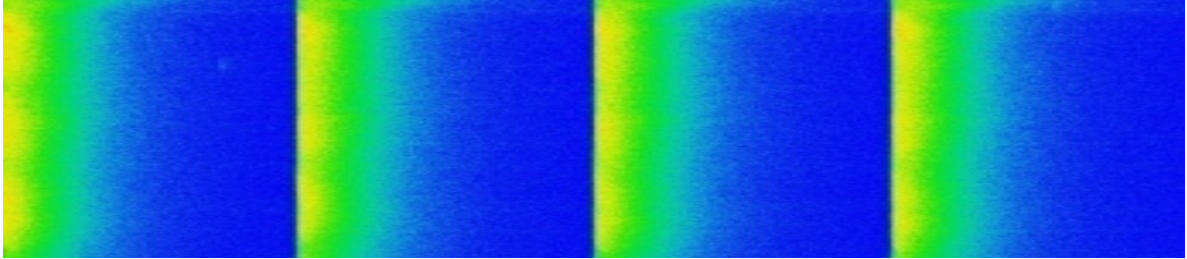
Figura 3. Cardiomiócito isolado incubado com o indicador fluorescente de Ca^{2+} (Fluo-4 AM). A linha de varredura (vermelha) foi posicionada no eixo longitudinal da célula, com o cuidado de não cruzar regiões de núcleos.

Foram utilizados somente os cardiomiócitos que estavam em boas condições, com as bordas (direita e esquerda) e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso, sem apresentar contrações involuntárias. Os registros foram sempre feitos até quatro horas após o isolamento dos cardiomiócitos e na temperatura ambiente ($\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

As imagens obtidas foram processadas através de um software desenvolvido em plataforma MatLab[®], pelo professor do curso de Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Viçosa, Dr. Leonardo Bonato Félix. As variáveis analisadas foram: amplitude do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (F/F_0); tempo para o pico do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (tempo compreendido desde a estimulação elétrica até a fluorescência máxima, ms) e tempo para 50% do decaimento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (tempo compreendido desde a fluorescência máxima até a metade do retorno à fluorescência basal, ms).

Os parâmetros avaliados são demonstrados na Figura 4. Durante cada dia de experimento do transiente de Ca^{2+} , foram analisados cardiomiócitos isolados de animais de um determinado grupo experimental e do seu respectivo grupo controle.

A)



B)

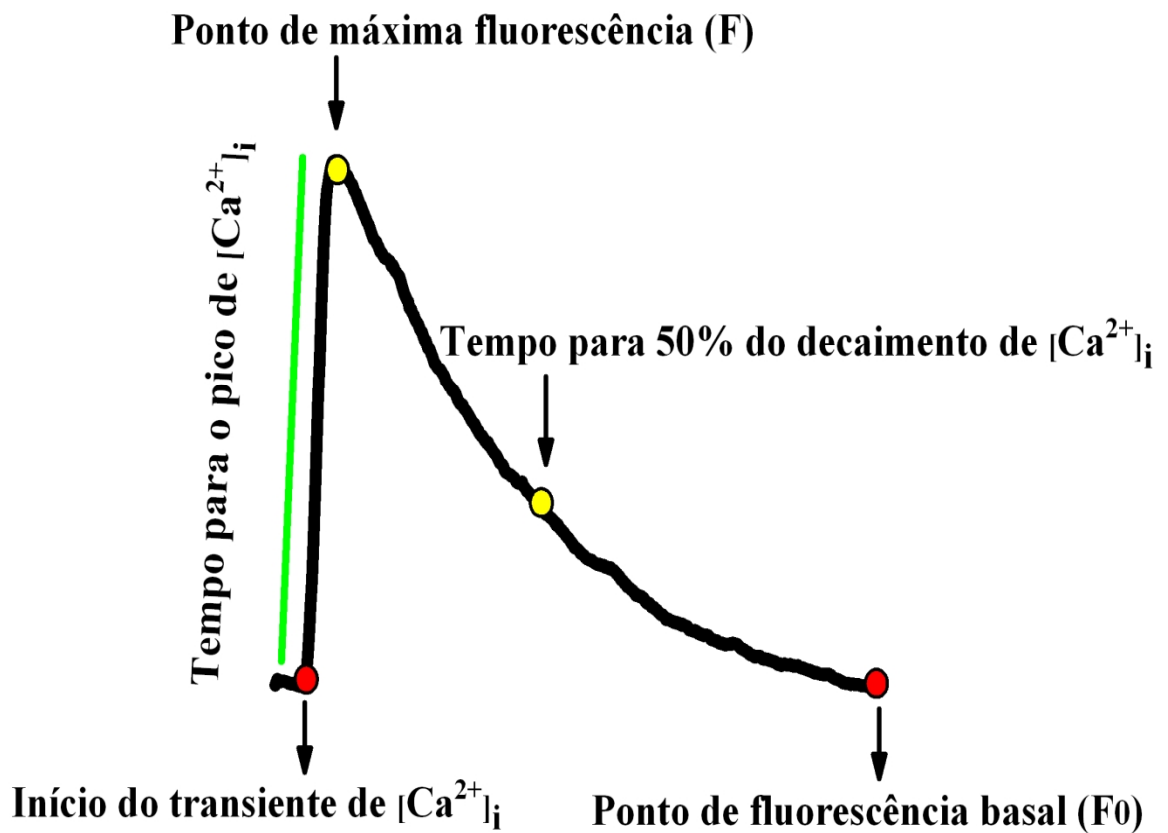


Figura 4. A) Traçados representativos das imagens de fluorescência para o transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em cardiomiócitos isolados de ratos. B) Resultado da análise da imagem do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e os parâmetros avaliados.

3.9 - Expressão de proteínas cardíacas:

As medidas da expressão da FLBt (fosfolambam total), da FLB_{ser16} (fosfolambam fosforilada no resíduo de serina 16), do NCX (canal trocador Na⁺/Ca²⁺) e da SERCA2a (Ca²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático) no ventrículo esquerdo dos animais foram feitas por meio da técnica de eletroforese de proteínas, *Western Blot*, conforme descrito por Fernandes et al. (2012). As amostras dos ventrículos foram homogeneizadas através de um homogeneizador de tecidos Polytron (PT-K Brinkman Instruments) em volumes (9X seu peso) de tampão de lise hipotônico contendo tampão de fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), sacarose (0,3 M), DTT (0,5 mM), EDTA (1 mM; pH 8,0), PMSF (0,3 mM), NaF (10 mM) e coquetel de inibidor de fosfatase (1:100; Sigma-Aldrich-EUA). O processo de homogeneização foi realizado a 4°C, três vezes durante dez segundos com intervalos de 20 segundos entre as homogeneizações. O homogenato foi centrifugado a 12.000 rpm por vinte minutos a 4°C. O sobrenadante foi então transferido para tubos de 1,5 ml. A concentração de proteína das amostras foi analisada por meio do método de Bradford (Biorad-EUA). As alíquotas dos homogenatos foram armazenadas em freezer -80°C até serem utilizadas.

As amostras foram diluídas em tampão da amostra (4X tris HCl/SDS pH=6.8, 3% glicerol, 1% SDS, 0,6% β-mercaptoetanol, azul de bromofenol). Para separação, foram aplicados 60 µg de proteína em gel de SDS-PAGE. As proteínas presentes nas amostras foram separadas eletroforéticamente em gel de SDS-poliacrilamida (6 e 8%, dependendo do peso molecular da proteína a ser estudada). Após serem separadas em gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) em tampão de transferência contendo Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%. A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3%. Após este procedimento, as membranas foram lavadas duas vezes com solução tampão (TBS: Tris 10 mM pH 7,6 e NaCl 150 mM). Em seguida, o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos foi realizado por meio de uma mistura contendo TBS com o detergente tween 20 (0,1%) e leite desnatado (5%) por 120 minutos em temperatura ambiente (20-25°C) com agitação constante.

A membrana, então, foi incubada com o anticorpo primário diluído na solução bloqueadora (TBS e albumina 3%) a 4°C por 12 horas com agitação constante. Os seguintes anticorpos primários (Abcam, Cambridge, MA, EUA) foram utilizados, com as respectivas diluições: anticorpo policlonal para a FLBt (1:1000), anticorpo policlonal para a FLB_{ser16} (1:1000), anticorpo policlonal para a SERCA2a (1:2500), anticorpo monoclonal para o NCX

(1:1000) e anticorpo monoclonal para o GAPDH (1:1000). Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução de TBS-T. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase em solução bloqueadora (TBS-T e leite desnatado 1%) por uma hora e meia em temperatura ambiente com agitação constante. Os seguintes anticorpos secundários (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) foram utilizados, com as respectivas diluições: IgG anti-coelho (1:2500) ou anti-camundongo (1:2000). Após a incubação com o anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução de TBS-T para remover o excesso de anticorpo.

Por fim, a imuno-deteção das bandas protéicas foi realizada por meio do método de quimioluminescência (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, NJ, EUA) e a intensidade das mesmas, avaliadas por análise densitométrica através do software ImageJ. Foram utilizados o sistema Mini Protean III-Tetracell e Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BIORAD[®], CA, EUA). A expressão das proteínas estudadas foi normalizada pela expressão de GAPDH da mesma amostra.

3.10 - Avaliação da expressão gênica cardíaca:

A expressão gênica relativa da α -MCP (α -miosina de cadeia pesada), β -MCP (β -miosina de cadeia pesada), α -actina esquelética e FNA (fator natriurético atrial) no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos experimentais foi analisada por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), conforme descrito por Soci et al. (2011). Foi realizada extração do RNA total de 100 mg de cada amostra em 1 ml de trizol (Invitrogen Life Technologies, Reino Unido) conforme a indicação do fabricante. A integridade da amostra foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0,5 μ g/mL de brometo de etídeo, durante 40 min a 100 V e avaliada pela intensidade das bandas do RNA ribossomal 28S e 18S.

Sucedeu-se a síntese de cDNA com 2 μ g de RNA total. As amostras foram incubadas por uma hora a 42° com 0,5 μ g/mL de oligo dT (12-18 pb) a 65°C por 5 min, para se obter a primeira fita de cDNA. A transcrição reversa das amostras foi realizada em um volume total de 20 μ L contendo 3U de RNAsin (PROMEGA, EUA), 10 mM de dNTPs, 0,1M de DTT, 1X tampão da enzima, e 2,5 U de *SuperScript Reverse Transcriptase II* (Invitrogen Life Technologies, Reino Unido) pelo período de 1 hora a 42°C; subsequentemente a temperatura foi elevada a 95°C por 5 minutos e as amostras rapidamente colocadas em gelo.

As reações de RT-PCR foram realizadas pelo sistema da detecção do produto específico amplificado, no equipamento ABI 7700 (Applied-Biosystems, EUA) e com o composto fluorescente *SYBR-Green I*, conforme instruções do fabricante.

A expressão do RNA mensageiro (RNAm) dos marcadores de hipertrofia cardíaca patológica foi realizada através dos *primers*, que foram desenhados usando-se o programa *Primer 3 software* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), sendo utilizados:

α -MCP:

sense: 5'-CGA GTC CCA GGT CAA CAA G-3',

antisense: 5'-AGG CTC TTT CTG CTG GAC C-3';

β -MCP:

sense: 5'-CAT CCC CAA TGA GAC GAA G-3',

antisense: 5'-AGG CTC TTT CTG CTG GAC A-3';

ANP:

sense: 5'- CTT CGG GGG TAG GAT TGA C-3',

antisense: 5'-CTT GGG ATC TTT TGC GAT CT-3';

α -actina esquelética:

sense: 5'-ACC ACA GGC ATT GTT CTG GA-3',

antisense: 5'-TAA GGT AGT CAG TGA GGT CC-3';

GAPDH:

sense: 5'- GCT GAT GCC CCC ATG TTT G -3',

antisense: 5'- ACC AGT GGA TGC AGG GAT G -3'.

A expressão relativa dos genes estudados foi normalizada pela expressão do gene da GAPDH (DCT). A expressão gênica foi calculada usando-se as diferenças em valores de DCT entre as amostras (DDCT) e a equação 2^{-DDCT} .

3.11 - Análise estatística:

As pressuposições da Análise de Variância (ANOVA), de homogeneidade, de variâncias entre os grupos e de normalidade das observações, foram checadas e não foram detectadas violações que merecessem atenção.

As comparações entre os valores iniciais e finais das variáveis peso corporal, pressão arterial sistólica e frequência cardíaca de repouso, foram realizadas entre os grupos experimentais pela ANOVA de duas vias para medidas repetidas com *post-hoc* de Tukey.

Ao final dos tratamentos, as comparações entre as médias dos grupos para as variáveis

peso corporal, PAS, FCR, TTF, peso dos ventrículos, contratilidade celular, transiente de $[Ca^{2+}]_i$, expressão de proteínas e genes no ventrículo esquerdo, foram realizadas através de ANOVA de duas vias com *post-hoc* de Tukey. A relação entre o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e o TTF dos animais foi verificada por meio de regressão linear simples.

Todas as comparações foram feitas considerando os grupos com tempo experimental de 8 semanas e de 12 semanas, separadamente. Foram realizadas comparações através do teste t de *Student* não pareado entre os grupos NC8 vs. NC12, e HC8 vs. HC12, para verificação de possível efeito de tempo sobre todas as variáveis estudadas, e não foram encontradas diferenças entre os respectivos grupos experimentais.

Todos os procedimentos estatísticos foram realizados através do programa SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, EUA). Os resultados são apresentados como média \pm erro-padrão da média (EPM). Para todas as análises, adotou-se como nível de significância até 5%.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS:

4.1 - Características gerais e parâmetros cardiovasculares:

Os resultados obtidos referentes aos efeitos do treinamento físico aeróbio de baixa intensidade e do destreinamento sobre o peso corporal, peso dos ventrículos, peso relativo dos ventrículos, peso do ventrículo esquerdo, peso relativo do ventrículo esquerdo, peso do ventrículo direito e peso relativo do ventrículo direito dos animais dos grupos experimentais, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Peso corporal, peso dos ventrículos esquerdo e direito e peso relativo dos ventrículos direito e esquerdo dos animais normotensos e hipertensos.

	NC8	NT8	HC8	HT8	NC12	NDT	HC12	HDT
PC Inicial (g)	395 ± 12	380 ± 11	364 ± 11	355 ± 10	369 ± 12	397 ± 12	347 ± 11	364 ± 13
PC Final (g)	427 ± 13 [#]	423 ± 12 [#]	415 ± 12 [#]	392 ± 11 [#]	426 ± 14 [#]	458 ± 14 [#]	417 ± 13 [#]	441 ± 15 [#]
PV (g)	1,69 ± 0,11	1,97 ± 0,10	1,93 ± 0,10	2,04 ± 0,10	1,68 ± 0,09	1,87 ± 0,08	1,83 ± 0,08	2,12 ± 0,10 [‡]
PV/PC (mg/g)	3,97 ± 0,24	4,67 ± 0,11 [§]	4,63 ± 0,11 ⁺	5,36 ± 0,11 ^{+∞}	4,00 ± 0,20	4,08 ± 0,20	4,41 ± 0,19	4,83 ± 0,21 ⁺
PVE (g)	1,32 ± 0,09	1,48 ± 0,08	1,48 ± 0,08	1,51 ± 0,08	1,33 ± 0,05	1,41 ± 0,05	1,39 ± 0,05	1,59 ± 0,06 ^{+‡}
PVE/PC (mg/g)	3,09 ± 0,18	3,51 ± 0,17 [§]	3,56 ± 0,17 ⁺	3,95 ± 0,16 ^{+∞}	3,15 ± 0,14	3,09 ± 0,14	3,33 ± 0,13	3,64 ± 0,15 ⁺
PVD (g)	0,307 ± 0,03	0,364 ± 0,03	0,358 ± 0,03	0,381 ± 0,02	0,305 ± 0,02	0,353 ± 0,02	0,353 ± 0,02	0,387 ± 0,03
PVD/PC (mg/g)	7,14 ± 0,64	8,60 ± 0,59	8,60 ± 0,55	8,00 ± 0,55	7,18 ± 0,59	7,69 ± 0,59	8,46 ± 0,55	8,91 ± 0,64

Dados são média ± EPM de 8 animais em cada grupo. NC8, normotenso controle por 8 semanas. NT8, normotenso treinado por 8 semanas. HC8, hipertenso controle por 8 semanas. HT8, hipertenso treinado por 8 semanas. NC12, normotenso controle por 12 semanas. NDT, normotenso treinado por 8 e destreinado por 4 semanas. HC12, hipertenso controle por 12 semanas. HDT, hipertenso treinado por 8 e destreinado por 4 semanas. PC, peso corporal. PV, peso dos ventrículos. PVE, peso do ventrículo esquerdo. PVD, peso do ventrículo direito. [#], significativamente diferente do valor inicial dentro do mesmo grupo. ⁺, significativamente diferente do respectivo grupo NORMO. [∞], significativamente diferente do grupo HC8. [§], significativamente diferente do grupo NC8. [‡], significativamente diferente do grupo HC12.

Todos os animais aumentaram o peso corporal desde o início até o final dos períodos experimentais. Os animais SHR apresentaram maior peso relativo dos ventrículos e do ventrículo esquerdo ($P \leq 0,05$) quando comparados aos animais normotensos, o que indica hipertrofia ventricular provocada pela hipertensão. O programa de treinamento com corrida em esteira provocou aumento do peso relativo dos ventrículos, e do peso relativo do ventrículo esquerdo dos animais SHR e normotensos, o que indica hipertrofia ventricular provocada pelo exercício físico. Todavia, essas adaptações foram revertidas após 4 semanas de destreino ($P \leq 0,05$). A hipertensão e os tratamentos treinamento/destreino não afetaram o peso total e o peso relativo do ventrículo direito dos animais dos grupos experimentais ($P > 0,05$) (Tabela 1).

Os resultados obtidos referentes aos efeitos do treinamento físico aeróbio de baixa intensidade e do destreino sobre a PAS e a FCR dos animais dos grupos experimentais, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca de repouso (FCR) dos animais normotensos e hipertensos antes e após os tratamentos.

	NC8	NT8	HC8	HT8	NC12	NDT	HC12	HDT
PAS Inicial (mmHg)	110,0 ± 4,3	112,0 ± 2,9	176,6 ± 3,9 ⁺	176,2 ± 4,8 ⁺	110,0 ± 4,0	110,7 ± 4,0	182,0 ± 4,8 ⁺	178,7 ± 5,3 ⁺
PAS Final (mmHg)	107,0 ± 3,2	110,0 ± 3,2	178,0 ± 3,2 ⁺	161,2 ± 3,6 ^{#+∞}	110,0 ± 4,4	114,3 ± 4,4	183,0 ± 5,2 ⁺	182,5 ± 5,9 ⁺
FCR Inicial (bpm)	328 ± 8	340 ± 8	359 ± 8 ⁺	369 ± 8 ⁺	352 ± 10	356 ± 10	359 ± 9	373 ± 10
FCR Final (bpm)	330 ± 11	322 ± 10 [#]	352 ± 11	344 ± 10 [#]	364 ± 13	347 ± 13	407 ± 12 ^{#+}	393 ± 13 ^{#+}

Dados são média ± EPM de 8 animais em cada grupo. NC8, normotenso controle por 8 semanas. NT8, normotenso treinado por 8 semanas. HC8, hipertenso controle por 8 semanas. HT8, hipertenso treinado por 8 semanas. NC12, normotenso controle por 12 semanas. NDT, normotenso treinado por 8 e destreinado por 4 semanas. HC12, hipertenso controle por 12 semanas. HDT, hipertenso treinado por 8 e destreinado por 4 semanas. PAS, pressão arterial sistólica. FCR, frequência cardíaca de repouso. #, significativamente diferente do valor inicial dentro do mesmo grupo. +, significativamente diferente do respectivo grupo NORMO. ∞, significativamente diferente do grupo HC8.

A PAS foi maior nos animais SHR em comparação aos normotensos ($P \leq 0,05$). O programa de treinamento com corrida de baixa intensidade diminuiu a PAS nos animais do grupo HT8 em comparação aos seus respectivos valores iniciais, e em comparação aos animais do grupo HC8. Entretanto, o período de destreinamento por 4 semanas, reverteu essas adaptações nos animais SHR ($P \leq 0,05$). Os tratamentos treinamento/destreinamento não afetaram a PAS dos animais normotensos ($P > 0,05$) (Tabela 2).

A FCR inicial foi maior nos animais SHR em comparação aos normotensos, com tempo experimental de 8 semanas ($P \leq 0,05$) (Tabela 2). O programa de treinamento com corrida de baixa intensidade diminuiu a FCR nos animais dos grupos NT8 e HT8, o que indica bradicardia de repouso induzida pelo exercício físico. O destreinamento por 4 semanas, reverteu essas adaptações ($P \leq 0,05$) (Tabela 2).

4.2 - Medida da capacidade física:

Os resultados obtidos referentes aos efeitos do treinamento físico aeróbio de baixa intensidade e do destreinamento sobre o TTF dos animais dos grupos experimentais estão apresentados na Figura 5.

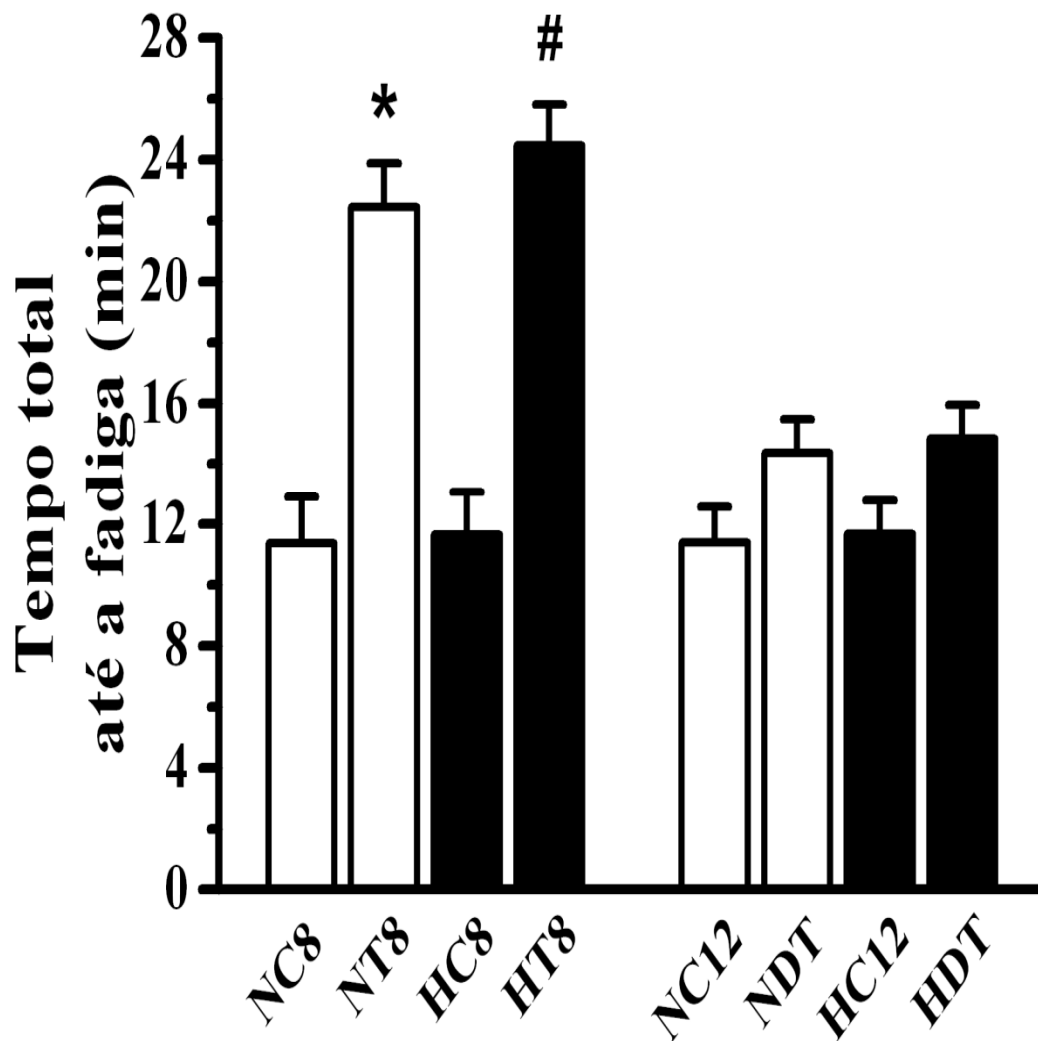


Figura 5. Tempo total de exercício até a fadiga (TTF) dos animais normotensos (barras abertas) e hipertensos (barras fechadas) no teste de desempenho após o treinamento e o destreinamento. Dados são média \pm EPM de 8 animais em cada grupo. NC8, normotenso controle por 8 semanas. NT8, normotenso treinado por 8 semanas. HC8, hipertenso controle por 8 semanas. HT8, hipertenso treinado por 8 semanas. NC12, normotenso controle por 12 semanas. NDT, normotenso treinado por 8 e destreinado por 4 semanas. HC12, hipertenso controle por 12 semanas. HDT, hipertenso treinado por 8 e destreinado por 4 semanas. *, significativamente diferente do grupo NC8. #, significativamente diferente do grupo HC8.

O programa de treinamento com corrida de baixa intensidade aumentou o TTF dos animais dos grupos NT8 e HT8 em comparação aos animais NC8 e HC8, respectivamente, ($P \leq 0,05$), o que indica melhora da capacidade física provocada pelo exercício físico. Todavia, após 4 semanas de destreinamento, esse aumento do TTF dos animais treinados regressou ao mesmo nível dos animais controles, tanto nos animais normotensos quanto nos hipertensos ($P \leq 0,05$) (Figura 5).

4.3 - Medida do transiente de $[Ca^{2+}]_i$:

As medidas dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ foram realizadas em cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de ratos de todos os grupos experimentais. A Figura 6 apresenta registros típicos das imagens de fluorescência e os traçados gerados para o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos dos animais dos grupos experimentais, incubados com o indicador fluorescente de Ca^{2+} (Fluo-4 AM), e estimulados eletricamente na frequência de 1 Hz.

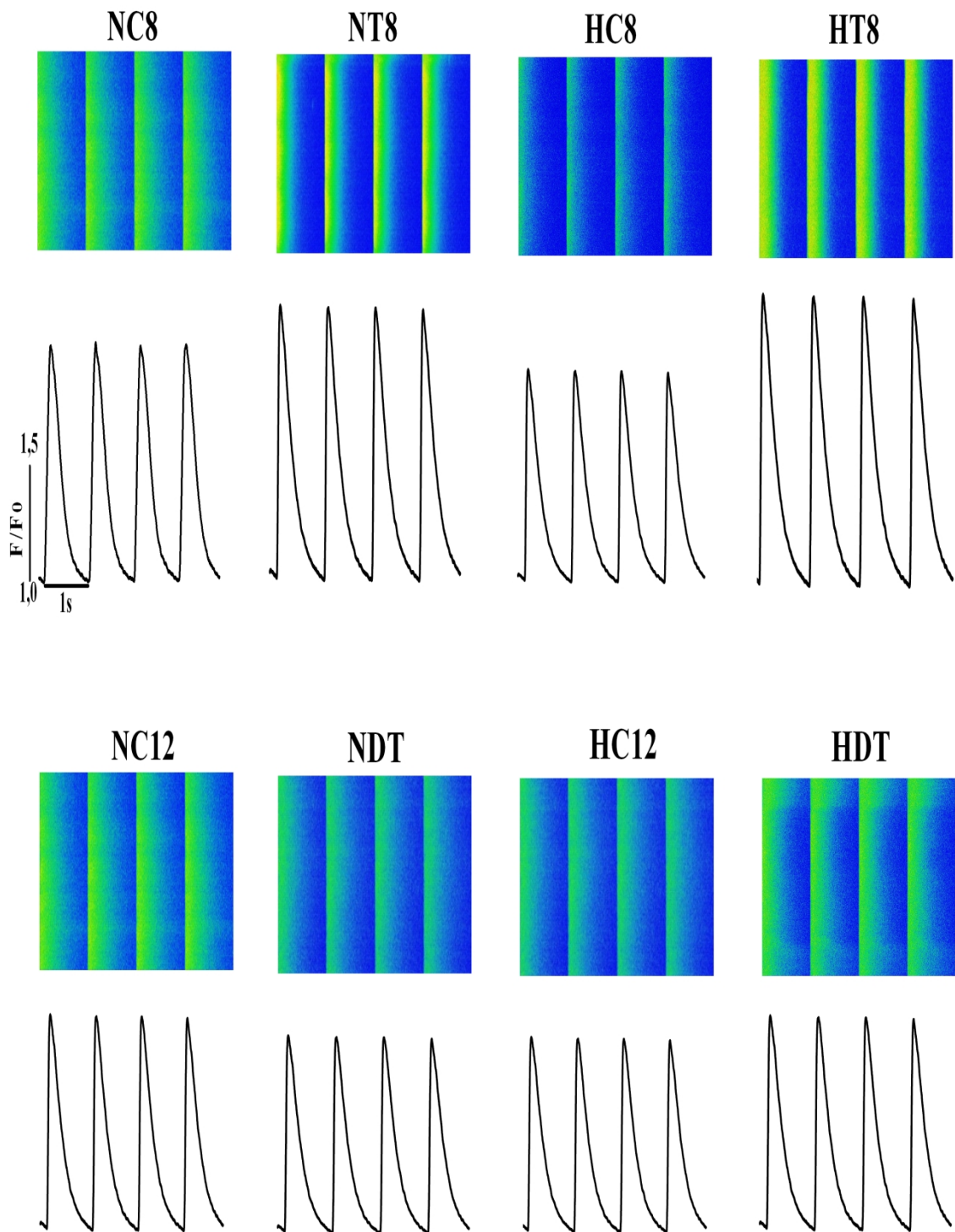


Figura 6. Registros típicos das imagens de fluorescência e os traçados gerados para o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos experimentais, incubados com o indicador fluorescente de Ca^{2+} (Fluo-4 AM), e estimulados eletricamente na frequência de 1 Hz. O sinal é mostrado como taxa de intensidade de fluorescência (F/F_0). A fluorescência máxima (F) foi normalizada em função

da fluorescência mínima (F_0) obtida antes da estimulação elétrica. NC8, normotenso controle por 8 semanas. NT8, normotenso treinado por 8 semanas. HC8, hipertenso controle por 8 semanas. HT8, hipertenso treinado por 8 semanas. NC12, normotenso controle por 12 semanas. NDT, normotenso treinado por 8 e destreinado por 4 semanas. HC12, hipertenso controle por 12 semanas. HDT, hipertenso treinado por 8 e destreinado por 4 semanas.

Como apresentado nas Figuras 6 e 7A, os cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos NT8 e HT8 apresentaram amplitudes dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ que foram, respectivamente, 13,8% e 23,7% maiores ($P \leq 0,05$) comparadas às dos cardiomiócitos dos animais dos grupos NC8 e HC8, enquanto que o destreinamento reverteu essas adaptações ($P \leq 0,05$). Não foram encontradas diferenças nas amplitudes dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ entre os cardiomiócitos dos ratos normotensos e hipertensos, após o treinamento/destreinamento ($P > 0,05$). É importante ressaltar que não foram encontradas diferenças ($P > 0,05$) na fluorescência mínima (F_0) do $[Ca^{2+}]_i$ durante a diástole, entre os cardiomiócitos de todos grupos experimentais.

O programa de treinamento com corrida de baixa intensidade diminuiu ($P \leq 0,05$) o tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 7B) e o tempo para 50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 7C) nos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos NT8 e HT8, embora após o período de destreinamento essas adaptações foram revertidas ($P \leq 0,05$). Esses parâmetros foram significativamente prolongados nos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo dos animais SHR em comparação aos dos animais normotensos após o treinamento/destreinamento ($P \leq 0,05$), exceto pelo tempo para 50% decaimento de $[Ca^{2+}]_i$ que foi similar nos cardiomiócitos dos grupos NT8 e HT8 após o treinamento.

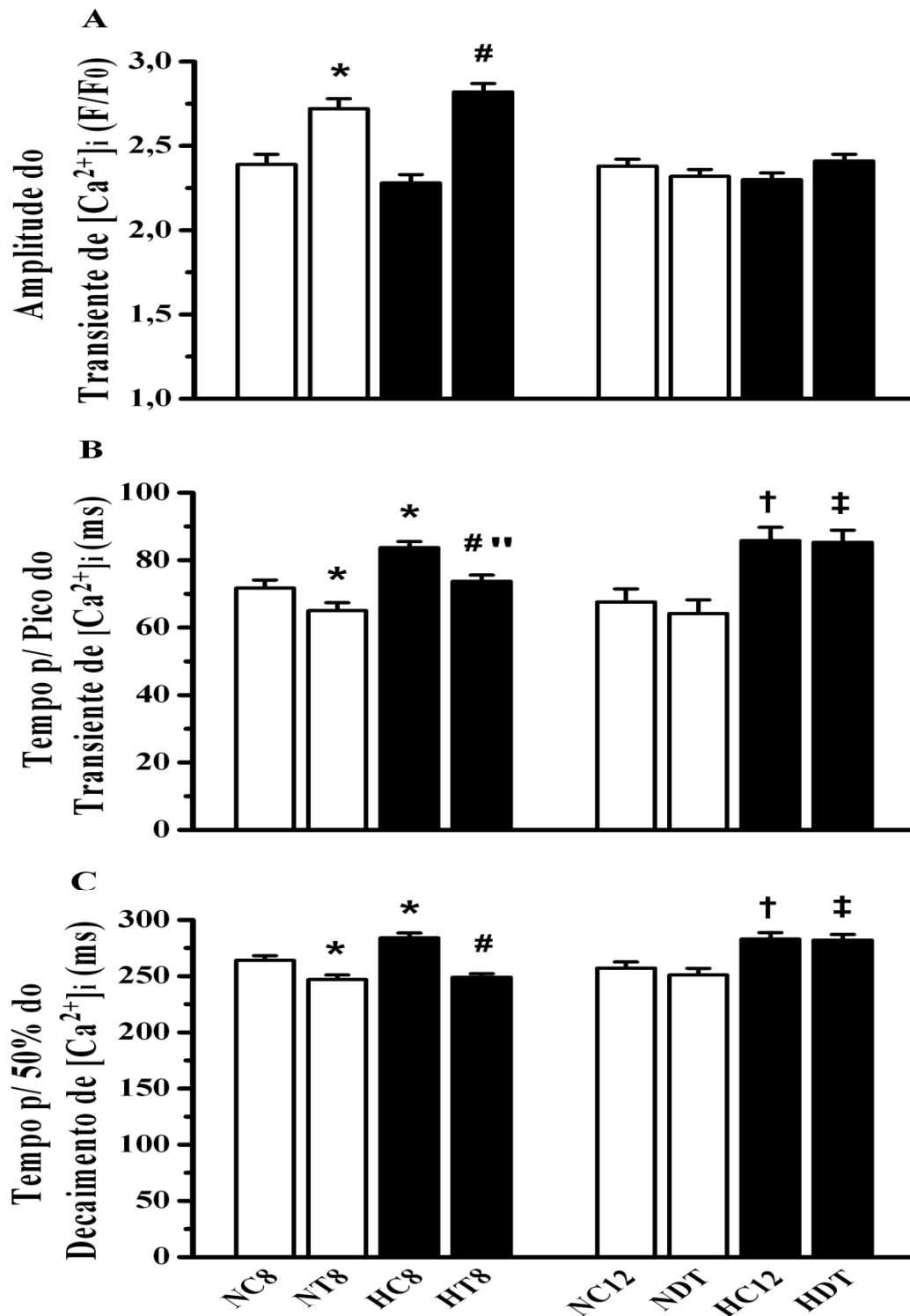


Figura 7. Transiente de $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais normotensos (barras abertas) e hipertensos (barras fechadas). (A) Amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (F/F0). (B) Tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (ms). (C) Tempo para 50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$ (ms). NC8, normotenso controle por 8 semanas. NT8, normotenso treinado por 8 semanas. HC8, hipertenso controle por 8 semanas. HT8, hipertenso treinado por 8 semanas. NC12, normotenso controle por 12 semanas. NDT, normotenso

treinado por 8 e destreinado por 4 semanas. HC12, hipertenso controle por 12 semanas. HDT, hipertenso treinado por 8 e destreinado por 4 semanas. Dados são média \pm EPM de 70-80 células em cada grupo. *, significativamente diferente do grupo NC8. #, significativamente diferente do grupo HC8. ¨, significativamente diferente do grupo NT8. †, significativamente diferente do grupo NC12. ‡, significativamente diferente do grupo NDT.

Além disso, foram realizadas correlações entre a amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, tempo para 50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$ dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo e o TTF alcançado pelos animais normotensos e hipertensos durante o teste de corrida progressivo, utilizado para avaliar a capacidade física dos animais. Assim, o valor médio da amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, do tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e do tempo para 50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$ de cada animal foi plotado em relação ao tempo de fadiga individual (TTF). Como observado na Figura 8A e B, houve correlação forte e positiva ($r = 0,73$ e $0,76$, $P < 0,001$) entre a amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo e o TTF dos animais normotensos e hipertensos, respectivamente. Observou-se também correlação forte e negativa entre o tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 8C e D, $r = -0,75$ e $-0,81$, $P < 0,001$) e entre o tempo para 50% decaimento de $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 8E e F, $r = -0,87$ e $-0,91$, $P < 0,001$) dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo e o TTF dos animais normotensos e hipertensos, respectivamente.

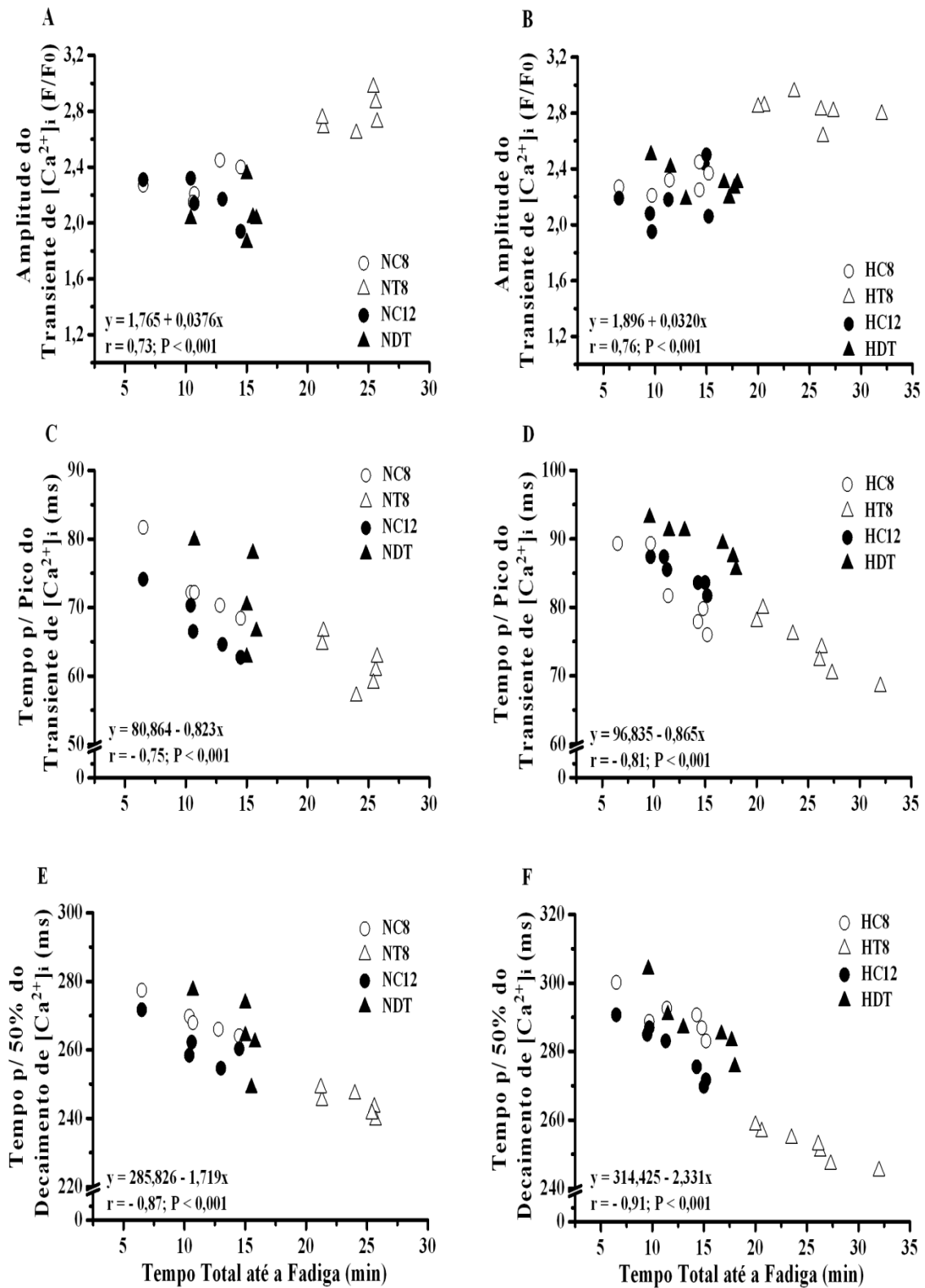


Figura 8. Correlações entre o tempo total de exercício até a fadiga (TTF) e a amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e tempo para 50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$ dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais

normotensos (A, C e E) e hipertensos (B, D e F). NC8, normotenso controle por 8 semanas. NT8, normotenso treinado por 8 semanas. HC8, hipertenso controle por 8 semanas. HT8, hipertenso treinado por 8 semanas. NC12, normotenso controle por 12 semanas. NDT, normotenso treinado por 8 e destreinado por 4 semanas. HC12, hipertenso controle por 12 semanas. HDT, hipertenso treinado por 8 e destreinado por 4 semanas. Os triângulos e círculos abertos/fechados representam as médias de cada parâmetro dos ratos normotensos e hipertensos.

4.4 - Medida da contratilidade celular:

As medidas de contratilidade celular foram realizadas em cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de ratos de todos os grupos experimentais. A Figura 9 apresenta traçados típicos das contrações celulares dos grupos experimentais, quando estimuladas eletricamente na frequência de 1 Hz.

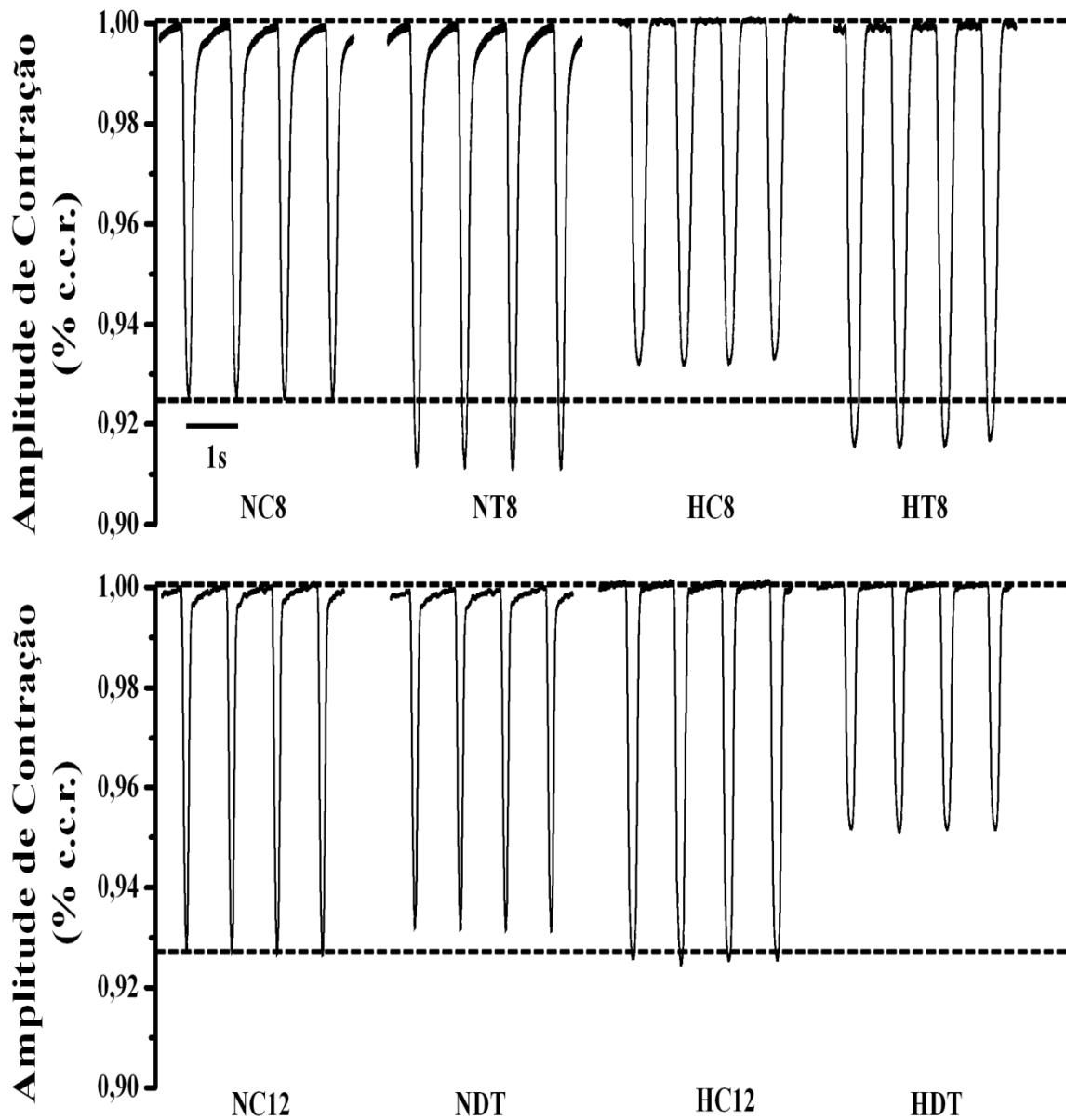


Figura 9. Registros representativos das contrações dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos experimentais. A amplitude de contração é expressa como percentual de variação do comprimento celular de repouso (% c.c.r.) após o estímulo elétrico a 1 Hz. NC8, normotenso controle por 8 semanas. NT8, normotenso treinado por 8 semanas. HC8, hipertenso controle por 8 semanas. HT8, hipertenso treinado por 8 semanas. NC12, normotenso controle por 12 semanas. NDT, normotenso treinado por 8 e destreinado por 4 semanas. HC12, hipertenso controle por 12 semanas. HDT, hipertenso treinado por 8 e destreinado por 4 semanas.

O programa de treinamento com corrida de baixa intensidade aumentou ($P \leq 0,05$) a amplitude de contração celular (expressa como percentual de variação do comprimento celular de repouso) nos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos NT8 (13,5%) e HT8 (14,7%) em comparação aos dos grupos NC8 e HC8, respectivamente. Após o período de destreino, essas adaptações foram revertidas ($P \leq 0,05$). Não foram encontradas diferenças ($P > 0,05$) na amplitude de contração celular, entre os cardiomiócitos dos animais normotensos e hipertensos após o treinamento/destreino, exceto para os do grupo HDT que apresentaram menor ($P \leq 0,05$) amplitude de contração celular em comparação aos dos grupos NDT e HC12 (Figuras 9 e 10A).

Como representado na Figura 10B e 10C, o treinamento com corrida de baixa intensidade aumentou ($P \leq 0,05$) a velocidade máxima de contração e a velocidade máxima de relaxamento dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais normotensos (14,5% e 20,5%) e hipertensos (25,3% e 53,4%) quando comparados aos cardiomiócitos dos animais dos grupos NC8 e HC8, respectivamente. Todavia, essas adaptações foram completamente revertidas após 4 semanas de destreino ($P \leq 0,05$). Esses parâmetros foram significativamente lentificados nos cardiomiócitos dos animais hipertensos em comparação aos dos animais normotensos, após o treinamento/destreino ($P \leq 0,05$), exceto pela velocidade máxima de contração que foi similar nos cardiomiócitos dos animais dos grupos NC12 e HC12 após o período de destreino.

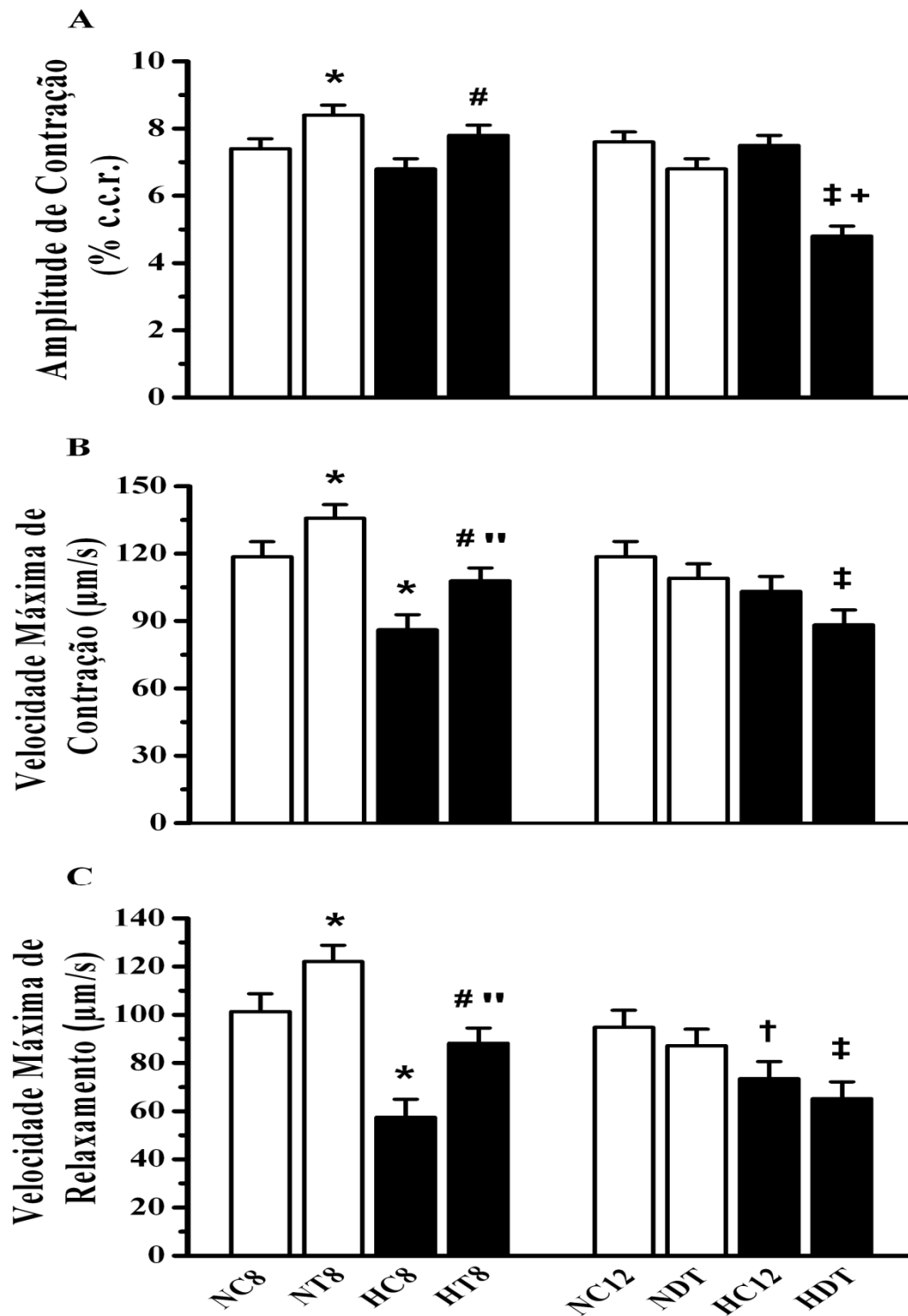


Figura 10. Contratilidade dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais normotensos (barras abertas) e hipertensos (barras fechadas). (A) Amplitude de contração (% de variação do comprimento celular de repouso). (B) Velocidade máxima de contração ($\mu\text{m/s}$). (C) Velocidade máxima de relaxamento ($\mu\text{m/s}$). NC8, normotenso controle por 8 semanas. NT8, normotenso treinado por 8 semanas. HC8, hipertenso controle por 8 semanas. HT8, hipertenso treinado por 8 semanas. NC12, normotenso controle por 12 semanas. NDT,

normotenso treinado por 8 e destreinado por 4 semanas. HC12, hipertenso controle por 12 semanas. HDT, hipertenso treinado por 8 e destreinado por 4 semanas. Dados são média \pm EPM de 90 células em cada grupo. *, significativamente diferente do grupo NC8. #, significativamente diferente do grupo HC8. ¨, significativamente diferente do grupo NT8. +, significativamente diferente do grupo HC12. †, significativamente diferente do grupo NC12. ‡, significativamente diferente do grupo NDT.

4.5 - Medida da expressão protéica:

O programa de treinamento com corrida de baixa intensidade provocou aumento na expressão protéica da SERCA2a, fosforilação da FLB_{ser16} e diminuição da relação FLBt/SERCA2a ($P \leq 0,05$) no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos NT8 e HT8, embora essas adaptações foram revertidas aos valores basais após 4 semanas de destreinamento ($P \leq 0,05$) (Figura 11B, C e E). A expressão protéica da FLBt e do NCX no ventrículo esquerdo dos animais normotensos e hipertensos, não foi afetada pelo treinamento/destreinamento ($P > 0,05$) (Figura 7A, D). Não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) na expressão protéica da FLBt, fosforilação da FLB_{ser16}, SERCA2a, NCX e na relação FLBt/SERCA2a no ventrículo esquerdo dos animais normotensos comparados aos hipertensos após o treinamento/destreinamento (Figura 11).

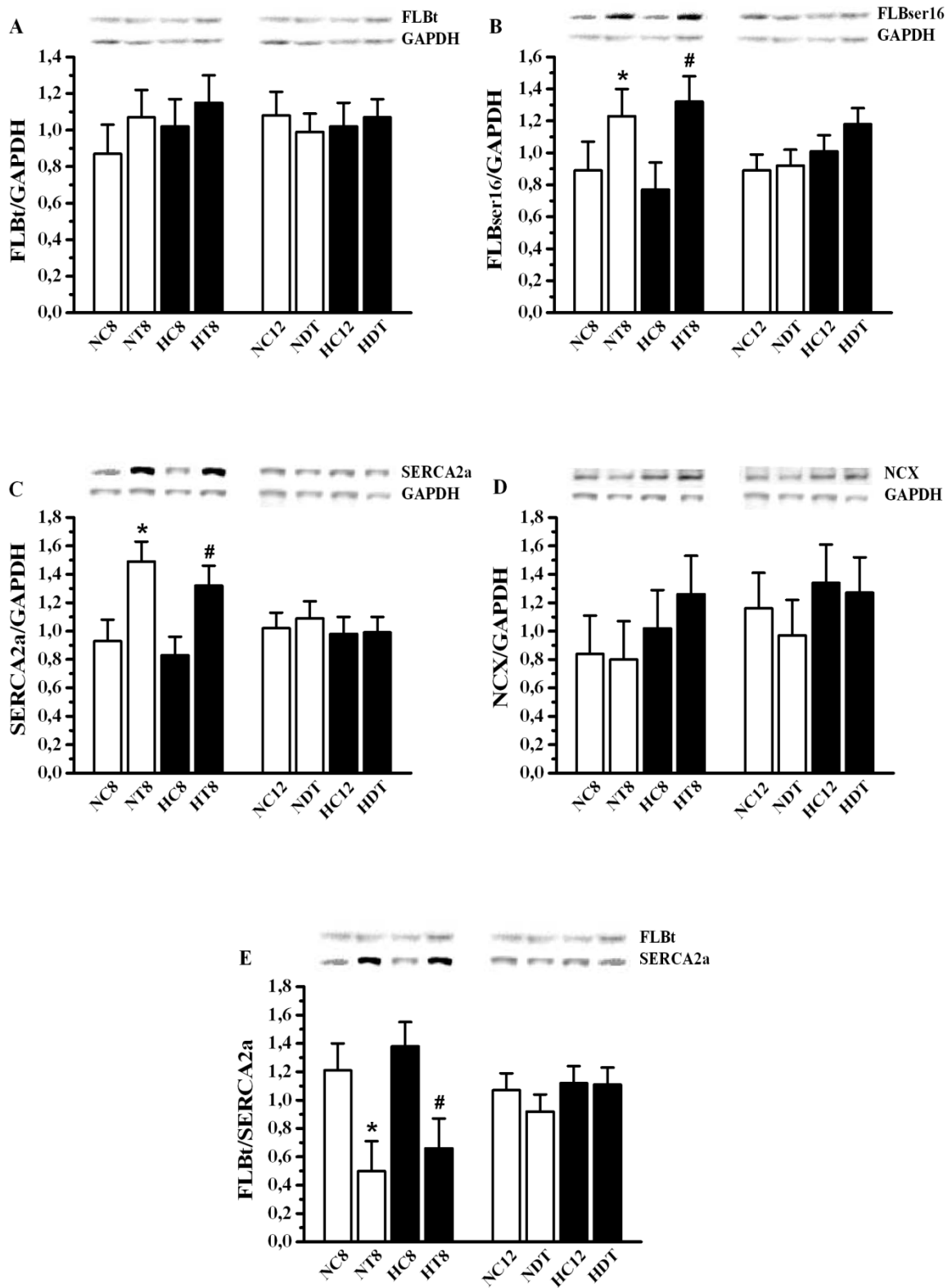


Figura 11. Expressão protéica no ventrículo esquerdo dos animais normotensos (barras abertas) e hipertensos (barras fechadas). (A) Fosfolambam total (FLBt). (B) Fosfolambam fosforilada na serina 16 (FLB_{ser16}). (C) Ca²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a).

(D) Canal trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). (E) Relação FLBt/SERCA2a. As bandas alvo foram normalizadas pela expressão da GAPDH. NC8, normotenso controle por 8 semanas. NT8, normotenso treinado por 8 semanas. HC8, hipertenso controle por 8 semanas. HT8, hipertenso treinado por 8 semanas. NC12, normotenso controle por 12 semanas. NDT, normotenso treinado por 8 e destreinado por 4 semanas. HC12, hipertenso controle por 12 semanas. HDT, hipertenso treinado por 8 e destreinado por 4 semanas. Dados são média \pm EPM de 6-7 animais em cada grupo. *, significativamente diferente do grupo NC8. #, significativamente diferente do grupo HC8.

4.6 - Medida da expressão gênica:

A hipertrofia cardíaca patológica é caracterizada pela indução de genes normalmente expressos durante o desenvolvimento fetal, como o FNA, e marcadores de hipertrofia cardíaca patológica, como a α -actina esquelética e a diminuição da relação α/β -MCP. Como representado na Figura 12, a hipertensão aumentou ($P \leq 0,05$) a expressão gênica do ANF (300%), da α -actina esquelética (250%), e diminuiu ($P \leq 0,05$) a relação α/β -MCP (70%) no ventrículo esquerdo dos animais SHR em comparação aos normotensos. Entretanto, o programa de treinamento com corrida de baixa intensidade foi capaz de normalizar ($P \leq 0,05$) a expressão gênica desses parâmetros no ventrículo esquerdo dos animais SHR, embora após 4 semanas de destreinamento, esses benefícios foram abolidos ($P \leq 0,05$). Não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) na expressão gênica do FNA, da α -actina esquelética e na relação α/β -MCP no ventrículo esquerdo dos animais normotensos após o treinamento/destreinamento.

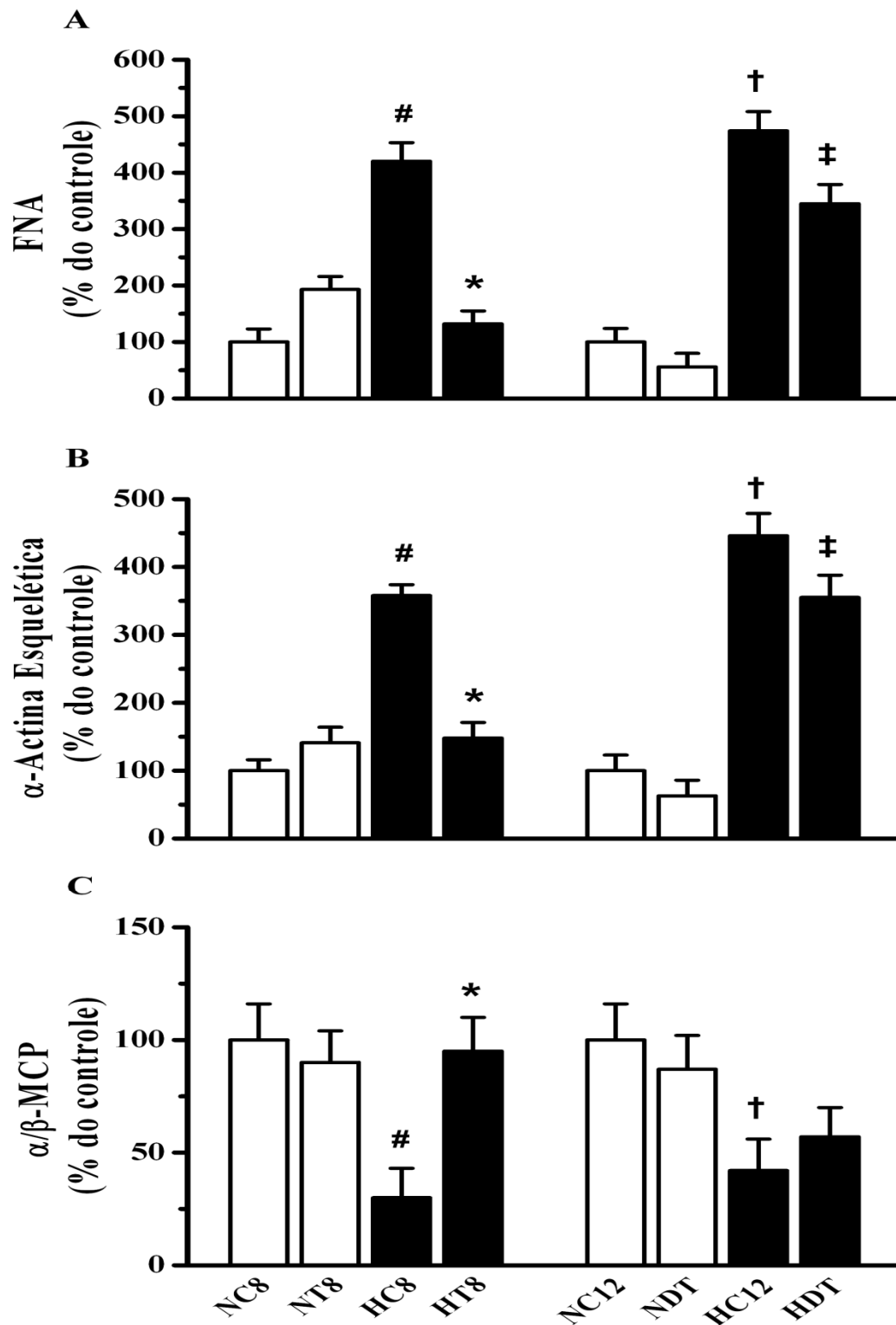


Figura 12. Expressão gênica no ventrículo esquerdo dos animais normotensos (barras abertas) e hipertensos (barras fechadas). (A) Fator natriurético atrial (FNA). (B) α -actina esquelética. (C) Relação α/β -miosina de cadeia pesada. Os genes alvo foram normalizados pela expressão gênica da GAPDH. NC8, normotenso controle por 8 semanas. NT8, normotenso treinado por 8 semanas. HC8, hipertenso controle por 8 semanas. HT8, hipertenso treinado por 8 semanas.

NC12, normotenso controle por 12 semanas. NDT, normotenso treinado por 8 e destreinado por 4 semanas. HC12, hipertenso controle por 12 semanas. HDT, hipertenso treinado por 8 e destreinado por 4 semanas. Dados são média \pm EPM de 5-6 animais em cada grupo. #, significativamente diferente do grupo NC8. *, significativamente diferente do grupo HC8. †, significativamente diferente do grupo NC12. ‡, significativamente diferente do grupo NDT.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, nós examinamos os efeitos do treinamento físico aeróbio de baixa intensidade e do destreinamento sobre parâmetros cardiovasculares, propriedades moleculares e mecânicas de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de ratos hipertensos na fase compensada da hipertensão arterial/hipertrofia cardíaca.

Nossos resultados mostraram que o programa de corrida em esteira de baixa intensidade aumentou a capacidade de corrida, avaliada através do TTF; induziu bradicardia de repouso, através da diminuição da FCR; provocou hipertrofia ventricular esquerda, através do aumento do peso relativo do ventrículo esquerdo; melhorou o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e a contratilidade de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo; aumentou a expressão de proteínas reguladoras do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ no ventrículo esquerdo, como a SERCA2a e a fosforilação da FLB_{ser16}, além de ter revelado uma forte associação entre o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e a capacidade para o exercício físico, tanto nos animais normotensos quanto nos hipertensos. Além disso, o programa de corrida de baixa intensidade reduziu a PAS e a expressão de genes marcadores de hipertrofia cardíaca patológica (FNA, α -actina esquelética e a β -MCP) no ventrículo esquerdo dos animais hipertensos. Entretanto, todas essas adaptações regressaram aos valores basais após 4 semanas de destreinamento, em ambos animais normotensos e hipertensos.

Esses dados estão de acordo com estudos que suportam a ideia de que o treinamento físico aeróbio de intensidade baixa a moderada provoca adaptações cardíacas benéficas em animais normotensos (Natali et al., 2002; Fenning et al., 2003; Bocalini et al., 2010) e hipertensos (Garciaarena et al., 2009; Carneiro-Júnior et al., 2010; Libonati et al., 2011; Rossoni et al., 2011; Roman-Campos et al., 2012). Todavia, essas adaptações cardíacas adquiridas com o treinamento aeróbio regular, são rapidamente perdidas após um período de destreinamento (Bocalini et al., 2010; Carneiro-Júnior et al., 2010).

Por outro lado, o treinamento físico de alta intensidade e longa duração, provocou remodelamento cardíaco adverso, através do aumento da fibrose miocárdica, disfunções ventriculares e o aparecimento de arritmias em ratos normotensos (Benito et al., 2011). Também foi mostrado recentemente, que o treinamento aeróbio de alta intensidade acelerou o remodelamento cardíaco adverso em ratas hipertensas, uma vez que a velocidade de corrida foi positivamente correlacionada com a ativação da expressão gênica de marcadores fenotípicos pró-fibróticos, e piora da função do ventrículo esquerdo (Rebelo et al., 2012).

Nossos dados mostraram que o programa de corrida em esteira de baixa intensidade reduziu a PAS dos animais hipertensos, embora essa adaptação foi revertida após 4 semanas de inatividade. É bem estabelecido na literatura que o exercício aeróbio regular reduz a pressão arterial em indivíduos hipertensos (Whelton et al., 2002; Chobanian et al., 2003; Pescatello et al., 2004; Hamer, 2006; Cornelissen & Smart, 2013), além do que, tem sido sugerido que a intensidade do exercício físico influencia esse efeito de diminuição da pressão arterial, uma vez que reduções mais altas têm sido observadas em intensidades de exercício físico mais baixas (Gava et al., 1995; Véras-Silva et al., 1997; Melo et al., 2003; Sun et al., 2008; Hua et al., 2009).

O exercício físico de alta intensidade pode aumentar a atividade do sistema nervoso simpático de tal forma que não haveria uma completa recuperação após cada sessão de exercício. Essa exposição crônica à atividade simpática alta poderia anular os benefícios do exercício físico sobre a diminuição da pressão arterial (Gava et al., 1995; Véras-Silva et al., 1997; Sun et al., 2008). Além do que, o exercício físico de alta intensidade, devido a maior sobrecarga física e o desgaste proporcionado, poderia dificultar a adesão da prática regular pelos indivíduos e aumentar o risco de acontecimento de eventos cardiovasculares inesperados, principalmente para aqueles hipertensos (Pescatello et al., 2004; Hua et al., 2009).

No início do período experimental, a FCR foi maior nos animais hipertensos em comparação aos normotensos. Dados epidemiológicos mostram que uma FCR elevada está relacionada ao aumento da morbidade e mortalidade cardiovascular na população em geral, e tem sido associada com um mau prognóstico em pacientes com problemas cardiovasculares (Jouven et al., 2005; Fox et al., 2008).

Como esperado, o programa de corrida em esteira de baixa intensidade aumentou a capacidade para o exercício físico, avaliada através do TTF, e diminuiu a FCR nos animais normotensos e hipertensos, embora após o período de destreinamento essas adaptações tenham regredido aos valores basais. A bradicardia de repouso tem sido considerada um marcador clássico das adaptações cardíacas ao treinamento físico aeróbio em animais experimentais (De Angelis et al., 2004; Evangelista et al., 2005; Schlüter et al., 2010) e em humanos (Serra-Grima et al., 2008; Boyett et al., 2013). Os valores mais baixos de FCR estão associados a um menor consumo de oxigênio pelo miocárdio e a um aumento do volume de ejeção, resultado de melhoras no ciclo cardíaco, capacidade contrátil celular cardíaca e modulação do sistema nervoso autônomo (Wisloff et al., 2001), embora tenha sido mostrado

que mesmo após o bloqueio do sistema nervoso autônomo, houve bradicardia de repouso induzida pelo exercício físico em atletas, mostrando que essa adaptação pode estar mais relacionada a uma diminuição da frequência cardíaca intrínseca (Boyett et al., 2013).

Nossos resultados mostraram que o condicionamento aeróbio melhorou parâmetros fisiológicos relevantes da saúde cardiovascular nos animais treinados, uma vez que a FCR está associada com o aumento da expectativa de vida e diminuição do acontecimento de eventos cardiovasculares (Morris & Froelicher, 1993; Jouven et al., 2005).

Mesmo durante o repouso, os SHR apresentam atividade simpática aumentada no coração e nos vasos sanguíneos, contribuindo para a manutenção da pressão arterial elevada nesses animais (Bing et al., 2002; Grassi et al., 2010). O treinamento físico aeróbio reduz a atividade simpática na periferia do sistema cardiovascular e contribui para a redução da frequência cardíaca e pressão arterial nesses animais (Gava et al., 1995; Bertagnolli et al., 2008). Apesar de não termos medido diretamente a atividade simpática, a redução da pressão arterial nos animais hipertensos, e a bradicardia de repouso induzida pelo exercício físico em ambos os animais normotensos e hipertensos após o programa de corrida em esteira de baixa intensidade, sugerem atenuação da atividade simpática nesses animais. Essas adaptações podem explicar as melhorias no desempenho físico, e nas propriedades moleculares e mecânicas de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais treinados.

Nesse estudo, nós mostramos que a hipertensão arterial e a hipertrofia ventricular esquerda ocorreram nos animais hipertensos em comparação aos normotensos. O programa de corrida em esteira de baixa intensidade provocou hipertrofia ventricular esquerda nos animais normotensos e aumentou a hipertrofia ventricular esquerda nos animais hipertensos. Todavia, essas adaptações foram revertidas após o período de destreinamento.

A resposta cardíaca a nível estrutural e funcional gerada pela sobrecarga de pressão, difere muito da resposta induzida pelo treinamento físico aeróbio. A duração do estímulo é determinante da resposta fenotípica, uma vez que o estímulo para a hipertrofia cardíaca patológica é crônico, e o para hipertrofia fisiológica é intermitente. A hipertrofia cardíaca patológica está associada com a morte celular, aumento da fibrose intersticial, diminuição da vascularização e reexpressão de genes fetais (ex: FNA, α -actina esquelética e a β -MCP), sendo que todos esses fatores contribuem para redução da contratilidade e o desenvolvimento de disfunções cardíacas (Mill et al., 1998; Mill et al., 2011).

Após o nascimento, a expressão da α -MCP, que possui maior atividade ATPásica e maior velocidade de contração, é predominante nos ventrículos, enquanto que a expressão da

β -MCP é suprimida. Entretanto, durante a vida, vários estímulos e dentre eles a hipertensão arterial, são capazes de modificar esse padrão de transcrição, sendo que a expressão gênica da β -MCP e de outros genes do programa fetal (ex: FNA, α -actina esquelética) passam a ser reexpressos durante o remodelamento celular. Como resultado, os cardiomiócitos reduzem a velocidade de encurtamento e tem a capacidade de relaxamento prejudicada, o que contribuiria para as disfunções contráteis cardíacas (Palmer, 2005; Mill et al., 2011). A expressão gênica desses marcadores é um critério importante para distinguir se os estímulos são apenas tróficos (crescimento rápido ou normal), ou se os estímulos são primariamente hipertróficos, indicando o início de uma resposta patológica (Chien et al., 1991). Nossos dados confirmam esses achados em ratos hipertensos, sendo que observamos uma lentificação do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e da velocidade de contração e relaxamento dos cardiomiócitos isolados, e um aumento na expressão dos marcadores de hipertrofia patológica (FNA, α -actina esquelética e β -MCP) no ventrículo esquerdo desses animais, quando comparados aos normotensos.

Por outro lado, a hipertrofia cardíaca fisiológica, crescimento do coração que ocorre em resposta ao treinamento físico crônico (ex: “coração de atleta”), compreende principalmente a hipertrofia dos cardiomiócitos e a gênese de vasos. Caracteriza-se por ser reversível e por uma morfologia cardíaca normal, sem fibrose ou apoptose, e por uma função cardíaca normal ou melhorada. Além disso, pode aumentar a expressão da α -MCP e/ou diminuir a expressão da β -MCP, contribuindo para melhoria da função cardíaca (Bernardo et al., 2010; Soci et al., 2011; Ellison et al., 2012).

De fato, nós mostramos que o programa de corrida em esteira de baixa intensidade foi capaz de aumentar e acelerar o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e a contratilidade dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos ratos normotensos e hipertensos. Em adição, o programa de corrida aplicado normalizou a expressão dos marcadores de hipertrofia cardíaca patológica (FNA, α -actina esquelética e a relação α/β -MCP) no ventrículo esquerdo dos ratos hipertensos, suportando a hipótese de que o treinamento físico aeróbio beneficia a função cardíaca, mesmo na presença de hipertrofia cardíaca patológica. Entretanto, nossos dados indicam que essas adaptações são mantidas somente durante a prática regular do exercício físico, uma vez que todas esses benefícios foram perdidos após 4 semanas de destreinamento, em ambos os animais hipertensos e normotensos.

O treinamento físico aeróbio regular provoca benefícios importantes em indivíduos portadores de disfunções cardíacas e com insuficiência cardíaca, na medida em que melhora a

função do coração, a saúde, a qualidade de vida, e reduz a morbidade e a mortalidade em indivíduos de ambos os sexos, de todas as idades e em todos os estágios das disfunções (Paffenbarger et al., 1993; Gulati et al., 2003). Dados epidemiológicos e de meta-análise indicam que a melhora da capacidade aeróbia ou da capacidade para o exercício físico, juntas ou isoladamente, podem reduzir efetivamente a mortalidade, os eventos cardíacos e o número de hospitalizações em homens e mulheres com problemas cardíacos estabelecidos, ou com alto risco de desenvolvimento (Myers et al., 2002, Kodoma et al., 2009). Portanto, o treinamento físico aeróbio regular melhora a condição física dos indivíduos na saúde e na presença de doenças cardíacas (Kemi & Wisloff, 2010).

A ação de bomba do coração origina-se da contração coordenada dos cardiomiócitos. Os cardiomiócitos são as células primárias do coração, e embora correspondam a aproximadamente 20% da população total de células cardíacas, os mesmos determinam mais de 90% da massa miocárdica, em função do tamanho de cada cardiomiócito (Bergmann et al., 2009). Os cardiomiócitos respondem de várias formas aos estímulos provocados pelo exercício físico, incluindo adaptações celulares e subcelulares que podem modular a contração intrínseca (Diffie, 2004; Kemi & Wisloff, 2010).

Quando a sobrecarga ou a intensidade do exercício físico aumenta, a força e a amplitude de contração de cada cardiomiócito também deve aumentar para garantir um volume de ejeção apropriado (Bers, 2002). O aumento do débito cardíaco é uma adaptação central provocada pelo treinamento físico aeróbio, uma vez que é o maior determinante do transporte de oxigênio e suprimento aos tecidos (Blomqvist & Saltin, 1983; Kemi & Wisloff, 2010). Portanto, a maioria das adaptações crônicas induzidas pelo treinamento físico sobre o coração, origina-se de adaptações nos cardiomiócitos isolados.

Os efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade baixa a moderada sobre a função de cardiomiócitos isolados, incluem melhorias nas propriedades contráteis e elétricas, algumas das quais nós já mostramos que ocorrem em ratos normotensos (Natali et al., 2002) e em ratos hipertensos (Carneiro-Júnior et al., 2010, Roman-Campos et al., 2012). Por outro lado, outros autores mostraram que melhorias na função de cardiomiócitos isolados de ratas normotensas, ocorrem apenas em resposta ao treinamento aeróbio de alta intensidade (Wisloff et al., 2001; Kemi et al., 2004; Kemi et al., 2005; Kemi et al., 2007).

O presente estudo mostrou adaptações funcionais provocadas pelo treinamento físico aeróbio de intensidade baixa sobre cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de ratos

normotensos e hipertensos, e identificou modificações em mecanismos subcelulares que podem explicar as melhorias observadas no inotropismo e lusitropismo celular.

Nossos achados confirmam que o programa de corrida em esteira de baixa intensidade melhorou a função sistólica celular, resultado do aumento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e da diminuição do tempo para liberação do $[Ca^{2+}]_i$, que juntos, explicam a maior amplitude e velocidade de contração celular observadas nos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos ratos normotensos e hipertensos treinados. Além disso, o programa de corrida em esteira de baixa intensidade melhorou a função diastólica celular, observada através do aumento da velocidade de relaxamento, que pode ser explicado pela diminuição do tempo para recaptção do $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos ratos normotensos e hipertensos treinados. Todavia, após o período de destreinamento, todas essas adaptações regressaram aos níveis correspondentes dos animais não treinados, tanto nos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais normotensos quanto nos hipertensos.

No coração, o transiente de $[Ca^{2+}]_i$, a contração e o relaxamento celular são modulados principalmente pela SERCA2a e seu regulador endógeno, a FLB, que quando está associada à SERCA2a, diminui o transporte de Ca^{2+} e a sua atividade de ATPase. O NCX também contribui para a remoção do Ca^{2+} dos cardiomiócitos durante o relaxamento. A SERCA2a remove a maior parte do Ca^{2+} do citosol (decaimento de Ca^{2+}) através de transporte ativo, e restaura a carga de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático antes da próxima contração (Bers, 2001).

A magnitude da remoção de Ca^{2+} do citosol, durante o relaxamento celular, é espécie-dependente, uma vez que durante esse processo, a fração de Ca^{2+} transportada para o retículo sarcoplasmático através da SERCA2a; a fração de Ca^{2+} transportada para fora dos cardiomiócitos através do NCX; e a fração de Ca^{2+} transportada pela Ca^{2+} ATPase do sarcolema junto com a captação mitocondrial de Ca^{2+} ; correspondem a 70, 28 e 2% em cardiomiócitos isolados de coelhos e, 92, 7 e 1% em cardiomiócitos isolados de ratos, respectivamente (Bassani et al., 1994). Nesse sentido, a magnitude dos efeitos do treinamento físico sobre esses sistemas, também deve diferir entre as espécies.

A fosforilação da FLB através da PKA e da CaMKII (nos resíduos de serina 16 e treonina 17, respectivamente), é o principal mediador do efeito positivo sobre o inotropismo e lusitropismo, provocado pela estimulação β -adrenérgica no músculo cardíaco, uma vez que ocorre a sua dissociação e conseqüentemente a remoção da sua inibição sobre a SERCA2a (Wegener et al., 1989; Mattiazzi et al., 2005).

O aumento na atividade da SERCA2a e da taxa de recaptação de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático induzido por essas fosforilações, provoca um aumento na velocidade de relaxamento celular, aumento do conteúdo de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, e conseqüentemente, um aumento da liberação de Ca^{2+} e da contratilidade celular durante a sístole (Bers, 2001; MacLennan & Kranias, 2003; Mattiazzi et al., 2005).

Nossos resultados mostraram que a hipertensão não afetou a expressão protéica da FLBt, da SERCA2a, do NCX, e a fosforilação da $\text{FLB}_{\text{ser16}}$ no ventrículo esquerdo dos animais SHR. Esses achados estão de acordo com os apresentados por Shorosfsky et al. (1999), que também não verificaram diferença na expressão protéica da FLBt e da SERCA2a no ventrículo esquerdo de animais SHR e controles. Alguns estudos também mostraram níveis similares na expressão protéica da FLBt, fosforilação da $\text{FLB}_{\text{ser16}}$ (Kolwicz et al., 2007) e expressão da SERCA2a (MacDonell et al., 2005) no ventrículo esquerdo de ratas SHR e controles, enquanto outros mostraram um aumento na expressão do NCX associado à hipertensão (MacDonell et al., 2005; Garcarena et al., 2009).

Por outro lado, o programa de corrida em esteira de baixa intensidade aplicado aumentou a fosforilação da $\text{FLB}_{\text{ser16}}$, expressão protéica da SERCA2a, sem alterações na expressão da FLBt e do NCX; provocando uma redução da razão FLBt/SERCA2a no ventrículo esquerdo dos ratos normotensos e hipertensos. Esses resultados indicam que a fosforilação da FLB no resíduo de serina 16 pela PKA, e a expressão protéica da SERCA2a no ventrículo esquerdo de ratos normotensos e hipertensos, são moduladas pelo treinamento aeróbio de baixa intensidade.

A diminuição da razão FLBt/SERCA2a aumenta a sensibilidade ao Ca^{2+} e a atividade enzimática da SERCA2a, uma vez que a FLB é o inibidor primário da SERCA2a (MacLennan & Kranias, 2003). Portanto, se a expressão da SERCA2a aumentou, enquanto a expressão da FLBt se manteve inalterada, conseqüentemente a razão FLBt/SERCA2a diminuiu em resposta ao programa de corrida em esteira de baixa intensidade aplicado, indicando redução da inibição da SERCA2a no ventrículo esquerdo.

O aumento da fosforilação da $\text{FLB}_{\text{ser16}}$ no ventrículo esquerdo dos animais normotensos e hipertensos treinados pode sugerir um aumento da atividade simpática no coração dos mesmos. A estimulação dos receptores β -adrenérgicos aumenta a fosforilação da $\text{FLB}_{\text{ser16}}$ através da via AMP cíclico/PKA conforme descrito na literatura (Bers, 2001; Mattiazzi et al., 2005). Todavia, esse mecanismo parece ter sido diferente em nosso estudo.

Outras cascatas subcelulares que também modulam a fosforilação/desfosforilação da FLB (Bers, 2001; Sabine et al., 1995) podem ter contribuído para esse achado.

O aumento da expressão protéica da SERCA2a também pode ter afetado/melhorado o inotropismo cardíaco, devido ao prolongamento do tempo de enchimento ventricular e ao maior acúmulo de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático (Kemi et al., 2008a).

Alguns estudos também mostraram que o exercício físico aeróbio de alta intensidade aumenta a expressão protéica da SERCA2a (Wisloff et al., 2001; Kemi et al., 2007; Kemi et al., 2008a), fosforilação da $\text{FLB}_{\text{thr17}}$ (Kemi et al., 2007), sem alteração dos níveis protéicos da FLBt (Kemi et al., 2007; Kemi et al., 2008a), no ventrículo esquerdo de ratas normotensas.

Em animais hipertensos, foi mostrado um aumento na expressão protéica da SERCA2a sem alteração no conteúdo de NCX após o treinamento físico com natação de intensidade baixa a moderada (Garciaarena et al., 2009). Outro estudo mostrou um aumento na fosforilação da $\text{FLB}_{\text{ser16}}$, da $\text{FLB}_{\text{thr17}}$, sem alteração no conteúdo protéico da FLBt, do NCX e da SERCA2a no ventrículo esquerdo de ratas SHR, após o treinamento com corrida em esteira de baixa intensidade (MacDonell et al., 2005). No trabalho de Kolwicz et al. (2007), o programa de corrida em esteira de baixa intensidade, não alterou a expressão protéica da FLBt, a fosforilação da $\text{FLB}_{\text{ser16}}$, porém aumentou a fosforilação da $\text{FLB}_{\text{thr17}}$ no ventrículo esquerdo de ratas SHR.

Sendo assim, o aumento na fosforilação da $\text{FLB}_{\text{ser16}}$ e expressão da SERCA2a no ventrículo esquerdo dos animais treinados, e a redução da razão FLBt/SERCA2a, são prováveis explicações para o aumento no transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e na amplitude de contração celular, redução da duração do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (diminuições do tempo para o pico do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e do tempo para 50% do decaimento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$) e aumento na velocidade de contração e relaxamento celular, observados em nosso estudo, nos animais normotensos e hipertensos, submetidos ao programa de corrida em esteira de baixa intensidade.

Entretanto, as adaptações cardiovasculares ao exercício físico regular são altamente dinâmicas, sendo que todas essas melhorias observadas nas propriedades moleculares e mecânicas dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo dos animais normotensos e hipertensos, em resposta ao programa de corrida em esteira de baixa intensidade por 8 semanas, foram completamente revertidas no período de apenas 4 semanas sem treinamento.

Nessa mesma linha, alguns autores já mostraram reversão da bradicardia de repouso induzida pelo treinamento físico com corrida em esteira, sobre o coração de ratos (Evangelista et al., 2005), e perda das melhorias sobre a função inotrópica e lusitrópica de músculos

papilares isolados de ratas treinadas em natação, após 2 semanas de destreinamento (Bocalini et al., 2010). Em nível celular, o aumento da contratilidade celular e da cinética do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de ratas, após o treinamento intervalado com corrida em esteira de alta intensidade por 13 semanas, foram revertidos completamente após 4 semanas de destreinamento (Kemi et al., 2004).

Nossos resultados fornecem evidências consistentes de que a função dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo é determinante da capacidade para o exercício físico. Nós mostramos que a capacidade física dos animais, medida através do TTF, correlacionou-se fortemente com melhorias das funções sistólica (aumento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e redução do tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$) e diastólica (redução do tempo para 50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$), tanto após o programa de corrida em esteira de baixa intensidade por 8 semanas, quanto após o período de destreinamento por 4 semanas, quando todos esses benefícios foram abolidos.

Esses resultados estão de acordo os de Kemi et al. (2004), que mostraram correlações similares entre o $VO_{2máx}$ (volume máximo de oxigênio) e as propriedades mecânicas de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de ratas, que melhoraram em resposta ao treinamento com corrida em esteira de alta intensidade, e foram anuladas após 4 semanas de destreinamento.

Todos esses dados em conjunto suportam a ideia de que os aspectos centrais das adaptações do miocárdio ao treinamento físico/destreinamento emergem das adaptações celulares e subcelulares. Embora o volume de ejeção ventricular seja regulado por fatores extrínsecos como o retorno venoso, a regulação neurohumoral e o pós-carga, estudos prévios identificaram correlações significantes entre a função contrátil de cardiomiócitos isolados e a função cardíaca *in vivo*, indicando uma contribuição fundamental das propriedades miocárdicas intrínsecas relacionadas aos níveis moleculares e celulares (Wisloff et al., 2001; Wisloff et al., 2002; Loennechen et al., 2001; Kemi et al., 2004).

A partir de todos esses resultados, o presente estudo permite sugerir que o treinamento físico aeróbio de baixa intensidade provoca adaptações substanciais na função de cardiomiócitos isolados que podem contribuir significativamente para melhora da saúde cardíaca e aumentar a resistência a problemas cardiovasculares. Os achados do estudo também mostraram que esses benefícios ocorrem em corações com hipertrofia patológica provocada pela hipertensão arterial.

O conjunto desses achados apresenta relevância clínica, na medida em que dá suporte para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas baseadas no treinamento físico aeróbio de baixa intensidade, objetivando a prevenção da insuficiência cardíaca como consequência da progressão da hipertrofia cardíaca patológica induzida pela hipertensão arterial. Além disso, demonstra os benefícios e a importância da manutenção permanente de um estilo de vida fisicamente ativo.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- O programa de corrida em esteira de baixa intensidade, reduziu a PAS de ratos hipertensos e a FCR de ratos normotensos e hipertensos. Após o período de destreinamento, essas adaptações foram revertidas;
- O programa de corrida em esteira de baixa intensidade, aumentou a amplitude e reduziu a duração das fases sistólica e diastólica do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de ratos normotensos e hipertensos. Após o período de destreinamento, essas adaptações foram revertidas;
- O programa de corrida em esteira de baixa intensidade, aumentou a amplitude de contração, a velocidade de contração e a velocidade de relaxamento de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de ratos normotensos e hipertensos. Após o período de destreinamento, essas adaptações foram revertidas;
- O programa de corrida em esteira de baixa intensidade, aumentou a fosforilação da FLB_{ser16} e a expressão protéica da SERCA2a no ventrículo esquerdo de ratos normotensos e hipertensos. Após o período de destreinamento, essas adaptações foram revertidas;
- O programa de corrida em esteira de baixa intensidade seguido de um período de destreinamento, não afetou a expressão das proteínas FLBt e NCX no ventrículo esquerdo de ratos normotensos e hipertensos;
- O programa de corrida em esteira de baixa intensidade, diminuiu a expressão gênica da α -actina esquelética, FNA, e aumentou a razão α -MCP/ β -MCP no ventrículo esquerdo de ratos hipertensos. Após o período de destreinamento, essas adaptações foram revertidas;
- O programa de corrida em esteira de baixa intensidade seguido de um período de destreinamento, não afetou a expressão gênica da α -actina esquelética, FNA e a razão α -MCP/ β -MCP no ventrículo esquerdo de ratos normotensos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baldwin KM, Cooke DA and Cheadle WG. Time course adaptations in cardiac and skeletal muscle to different running programs. *J Appl Physiol*, 42:267-72, 1977.

Bassani JW, Bassani RA and Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol*, 476:279-93, 1994.

Bassani RA, Mattiazzi A and Bers DM. CaMKII is responsible for activity-dependent acceleration of relaxation in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol*, 268:H703-12, 1995.

Benitah JP, Gomez AM, Bailly P, Da Ponte JP, Berson G, Delgado C and Lorente P. Heterogeneity of the early outward current in ventricular cells isolated from normal and hypertrophied rat hearts. *J Physiol*, 469:111-38, 1993.

Benito B, Gay-Jordi G, Serrano-Mollar A, Guasch E, Shi Y, Tardif JC, Brugada J, Nattel S and Mont L. Cardiac arrhythmogenic remodeling in a rat model of long-term intensive exercise training. *Circulation*, 123:13-22, 2011.

Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S and Frisen J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*, 324:98-102, 2009.

Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L and McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther*, 128:191-227, 2010.

Berridge MJ. Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium*, 40:405-12, 2006.

Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415:198-205, 2002.

Bers DM. Cardiac ryanodine receptor phosphorylation: target sites and functional consequences. *Biochem J*, 396:e1-3, 2006.

Bers DM. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2001.

Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol*, 70:23-49, 2008.

Bertagnolli M, Schenkel PC, Campos C, Mostarda CT, Casarini DE, Bello-Klein A, Irigoyen MC and Rigatto K. Exercise training reduces sympathetic modulation on cardiovascular system and cardiac oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*, 21:1188-93, 2008.

Bing OH, Conrad CH, Boluyt MO, Robinson KG and Brooks WW. Studies of prevention, treatment and mechanisms of heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. *Heart Fail Rev*, 7:71-88, 2002.

Blomqvist CG and Saltin B. Cardiovascular adaptations to physical training. *Annu Rev Physiol*, 45:169-89, 1983.

Bocalini DS, Carvalho EV, de Sousa AF, Levy RF and Tucci PJ. Exercise training-induced enhancement in myocardial mechanics is lost after 2 weeks of detraining in rats. *Eur J Appl Physiol*, 109:909-14, 2010.

Boluyt MO, Bing OH and Lakatta EG. The ageing spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from stable compensated hypertrophy to heart failure. *Eur Heart J*, 16 Suppl N:19-30, 1995.

Boyett MR, D'Souza A, Zhang H, Morris GM, Dobrzynski H, Monfredi O. Is the resting bradycardia in athletes the result of remodelling of the sinoatrial node rather than high vagal tone? *J Appl Physiol*, doi:10.1152/jappphysiol.01126.2012, 2013.

Brillantes AB, Ondrias K, Scott A, Kobrinsky E, Ondriasova E, Moschella MC, Jayaraman T, Landers M, Ehrlich BE and Marks AR. Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell*, 77:513-23, 1994.

Brooksby P, Levi AJ and Jones JV. Contractile properties of ventricular myocytes isolated from spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens*, 10:521-7, 1992.

Carneiro-Junior MA, Peluzio MC, Silva CH, Amorim PR, Silva KA, Souza MO, Castro CA, Roman-Campos D, Primola-Gomes TN and Natali AJ. Exercise training and detraining modify the morphological and mechanical properties of single cardiac myocytes obtained from spontaneously hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res*, 43:1042-6, 2010.

Cheng H, Lederer WJ and Cannell MB. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*, 262:740-4, 1993.

Cheng H and Lederer WJ. Calcium sparks. *Physiol Rev*, 88:1491-545, 2008.

Chien KR, Knowlton KU, Zhu H and Chien S. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *Faseb J*, 5:3037-46, 1991.

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr. and Roccella EJ. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*, 289:2560-72, 2003.

Collins HL, Loka AM and Dicarlo SE. Daily exercise-induced cardioprotection is associated with changes in calcium regulatory proteins in hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288:H532-40, 2005.

Cornelissen VA and Smart NA. Exercise Training for Blood Pressure: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Am Heart Assoc*, 2:e004473, 2013.

Craig BW, Martin G, Betts J, Lungren M, Lambret V and Kaiserauer S. The influence of training-detraining upon the heart, muscle and adipose tissue of female rats. *Mech Ageing Dev*, 57:49-61, 1991.

De Angelis K, Wichi RB, Jesus WR, Moreira ED, Morris M, Krieger EM and Irigoyen MC. Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. *J Appl Physiol*, 96:2174-8, 2004.

Diffie GM. Adaptation of cardiac myocyte contractile properties to exercise training. *Exerc Sport Sci Rev*, 32:112-9, 2004.

Doggrell SA and Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res*, 39:89-105, 1998.

Ellison GM, Waring CD, Vicinanza C and Torella D. Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms. *Heart*, 98:5-10, 2012.

Evangelista FS, Martuchi SED, Negrao CE and Brum PC. Loss of resting bradycardia with detraining is associated with intrinsic heart rate changes. *Braz J Med Biol Res*, 38:1141-6, 2005.

Evans SJ, Levi AJ and Jones JV. Wall stress induced arrhythmia is enhanced by low potassium and early left ventricular hypertrophy in the working rat heart. *Cardiovasc Res*, 29:555-62, 1995.

Fabiato A and Fabiato F. Dependence of the contractile activation of skinned cardiac cells on the sarcomere length. *Nature*, 256:54-6, 1975.

Fabiato A and Fabiato F. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Circ Res*, 40:119-29, 1977.

Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol*, 245:C1-14, 1983.

Fenning A, Harrison G, Dwyer D, Rose-Meyer R and Brown L. Cardiac adaptation to endurance exercise in rats. *Mol Cell Biochem*, 251:51-9, 2003.

Fernandes T, Magalhaes FC, Roque FR, Phillips MI and Oliveira EM. Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors: role of microRNAs-16, -21, and -126. *Hypertension*, 59:513-20, 2012.

Ferguson S, Gledhill N, Jamnik VK, Wiebe C and Payne N. Cardiac performance in endurance-trained and moderately active young women. *Med Sci Sports Exerc*, 33:1114-9, 2001.

Fox K, Ford I, Steg PG, Tendera M, Robertson M and Ferrari R. Heart rate as a prognostic risk factor in patients with coronary artery disease and left-ventricular systolic dysfunction (BEAUTIFUL): a subgroup analysis of a randomised controlled trial. *Lancet*, 372:817-21, 2008.

Garciaarena CD, Pinilla OA, Nolly MB, Laguens RP, Escudero EM, Cingolani HE and Ennis IL. Endurance training in the spontaneously hypertensive rat: conversion of pathological into physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension*, 53:708-14, 2009.

Gava NS, Veras-Silva AS, Negrao CE and Krieger EM. Low-intensity exercise training attenuates cardiac beta-adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 26:1129-33, 1995.

Giada F, Bertaglia E, De Piccoli B, Franceschi M, Sartori F, Raviele A and Pascotto P. Cardiovascular adaptations to endurance training and detraining in young and older athletes. *Int J Cardiol*, 65:149-55, 1998.

Gledhill N, Cox D and Jamnik R. Endurance athletes' stroke volume does not plateau: major advantage is diastolic function. *Med Sci Sports Exerc*, 26:1116-21, 1994.

Grassi G, Seravalle G and Quarti-Treviso F. The 'neuroadrenergic hypothesis' in hypertension: current evidence. *Exp Physiol*, 95:581-6, 2010.

Guatimosim S, Dilly K, Santana LF, Saleet Jafri M, Sobie EA and Lederer WJ. Local Ca^{2+} signaling and EC coupling in heart: Ca^{2+} sparks and the regulation of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient. *J Mol Cell Cardiol*, 34:941-50, 2002.

Gulati M, Pandey DK, Arnsdorf MF, Lauderdale DS, Thisted RA, Wicklund RH, Al-Hani AJ and Black HR. Exercise capacity and the risk of death in women: the St James Women Take Heart Project. *Circulation*, 108:1554-9, 2003.

Hamer M. The anti-hypertensive effects of exercise: integrating acute and chronic mechanisms. *Sports Med*, 36:109-16, 2006.

Hart G. Cellular electrophysiology in cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res*, 28:933-46, 1994.

Hasenfuss G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res*, 39:60-76, 1998.

Hua LP, Brown CA, Hains SJ, Godwin M and Parlow JL. Effects of low-intensity exercise conditioning on blood pressure, heart rate, and autonomic modulation of heart rate in men and women with hypertension. *Biol Res Nurs*, 11:129-43, 2009.

Jouven X, Empana JP, Schwartz PJ, Desnos M, Courbon D and Ducimetiere P. Heart-rate profile during exercise as a predictor of sudden death. *N Engl J Med*, 352:1951-8, 2005.

Kemi OJ and Wisloff U. Mechanisms of exercise-induced improvements in the contractile apparatus of the mammalian myocardium. *Acta Physiol (Oxf)*, 199:425-39, 2010.

Kemi OJ, Ceci M, Condorelli G, Smith GL and Wisloff U. Myocardial sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase function is increased by aerobic interval training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 15:145-8, 2008a.

Kemi OJ, Ellingsen O, Ceci M, Grimaldi S, Smith GL, Condorelli G and Wisloff U. Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca^{2+} cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. *J Mol Cell Cardiol*, 43:354-61, 2007.

Kemi OJ, Ellingsen O, Smith GL and Wisloff U. Exercise-induced changes in calcium handling in left ventricular cardiomyocytes. *Front Biosci*, 13:356-68, 2008b.

Kemi OJ, Haram PM, Loennechen JP, Osnes JB, Skomedal T, Wisloff U and Ellingsen O. Moderate vs. high exercise intensity: differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. *Cardiovasc Res*, 67:161-72, 2005.

Kemi OJ, Haram PM, Wisloff U and Ellingsen O. Aerobic fitness is associated with cardiomyocyte contractile capacity and endothelial function in exercise training and detraining. *Circulation*, 109:2897-904, 2004.

Kirchberger MA, Tada M and Katz AM. Adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation reaction and its relationship to calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 249:6166-73, 1974.

Kodama S, Saito K, Tanaka S, Maki M, Yachi Y, Asumi M, Sugawara A, Totsuka K, Shimano H, Ohashi Y, Yamada N, Sone H. Cardiorespiratory fitness as a quantitative predictor of all-cause mortality and cardiovascular events in healthy men and women. A meta-analysis. *JAMA*, 301:2024-35, 2009.

Kolwicz SC, Kubo H, MacDonnell SM, Houser SR and Libonati JR. Effects of forskolin on inotropic performance and phospholamban phosphorylation in exercise-trained hypertensive myocardium. *J Appl Physiol*, 102:628-33, 2007.

Kolwicz SC, MacDonnell SM, Renna BF, Reger PO, Seqqat R, Rafiq K, Kendrick ZV, Houser SR, Sabri A and Libonati JR. Left ventricular remodeling with exercise in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297:H1361-8, 2009.

Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB and Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*, 322:1561-6, 1990.

Libonati JR, Sabri A, Xiao C, MacDonnell SM and Renna BF. Exercise training improves systolic function in hypertensive myocardium. *J Appl Physiol*, 111:1637-43, 2011.

Loennechen JP, Stoylen A, Beisvag V, Wisloff U and Ellingsen O. Regional expression of endothelin-1, ANP, IGF-1, and LV wall stress in the infarcted rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280:H2902-10, 2001.

MacDonnell SM, Kubo H, Crabbe DL, Renna BF, Reger PO, Mohara J, Smithwick LA, Koch WJ, Houser SR and Libonati JR. Improved myocardial beta-adrenergic responsiveness and signaling with exercise training in hypertension. *Circulation*, 111:3420-8, 2005.

MacLennan DH and Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4:566-77, 2003.

Mattiazzi A, Mundina-Weilenmann C, Guoxiang C, Vittone L and Kranias E. Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc Res*, 68:366-75, 2005.

McCrossan ZA, Billeter R and White E. Transmural changes in size, contractile and electrical properties of SHR left ventricular myocytes during compensated hypertrophy. *Cardiovasc Res*, 63:283-92, 2004.

McMullen JR and Jennings GL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34:255-62, 2007.

Melo RM, Martinho E, Jr. and Michelini LC. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. *Hypertension*, 42:851-7, 2003.

Mill JG, Novaes MA, Galon M, Nogueira JB and Vassallo DV. Comparison of the contractile performance of the hypertrophied myocardium from spontaneous hypertensive rats and normotensive infarcted rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 76:387-94, 1998.

Mill JG, Stefanon I, dos Santos L and Baldo MP. Remodeling in the ischemic heart: the stepwise progression for heart failure. *Braz J Med Biol Res*, 44:890-8, 2011.

Mitra R and Morad M. Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83:5340-4, 1986.

Miyai N, Arita M, Miyashita K, Morioka I, Shiraishi T, Nishio I and Takeda S. Antihypertensive effects of aerobic exercise in middle-aged normotensive men with exaggerated blood pressure response to exercise. *Hypertens Res*, 25:507-14, 2002.

Moraes-Silva IC, De La Fuente RN, Mostarda C, Rosa K, Flues K, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, De Angelis K, Krieger EM and Irigoyen MC. Baroreflex deficit blunts exercise training-induced cardiovascular and autonomic adaptations in hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 37:e114-20, 2010.

Morris CK and Froelicher VF. Cardiovascular benefits of improved exercise capacity. *Sports Med*, 16:225-36, 1993.

Mujika I and Padilla S. Cardiorespiratory and metabolic characteristics of detraining in humans. *Med Sci Sports Exerc*, 33:413-21, 2001.

Mujika I and Padilla S. Muscular characteristics of detraining in humans. *Med Sci Sports Exerc*, 33:1297-303, 2001.

Myers J, Prakash H, Froelicher V, Do D, Partington S, Atwood JE. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. *N Eng J Med*, 346:793-801, 2002.

Natali AJ, Turner DL, Harrison SM and White E. Regional effects of voluntary exercise on cell size and contraction-frequency responses in rat cardiac myocytes. *J Exp Biol*, 204:1191-9, 2001.

Natali AJ, Wilson LA, Peckham M, Turner DL, Harrison SM and White E. Different regional effects of voluntary exercise on the mechanical and electrical properties of rat ventricular myocytes. *J Physiol*, 541:863-75, 2002.

Nayler WG, Daile P, Chipperfield D and Gan K. Effect of ryanodine on calcium in cardiac muscle. *Am J Physiol*, 219:1620-6, 1970.

Okamoto K and Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*, 27:282-93, 1963.

Paffenbarger RS, Jr., Hyde RT, Wing AL, Lee IM, Jung DL and Kampert JB. The association of changes in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. *N Engl J Med*, 328:538-45, 1993.

Palmer BM. Thick filament proteins and performance in human heart failure. *Heart Fail Rev*, 10:187-97, 2005.

Pelliccia A, Maron BJ, De Luca R, Di Paolo FM, Spataro A and Culasso F. Remodeling of left ventricular hypertrophy in elite athletes after long-term deconditioning. *Circulation*, 105:944-9, 2002.

Pereira M, Lunet N, Azevedo A and Barros H. Differences in prevalence, awareness, treatment and control of hypertension between developing and developed countries. *J Hypertens*, 27:963-75, 2009.

Pescatello LS, Franklin BA, Fagard R, Farquhar WB, Kelley GA and Ray CA. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. *Med Sci Sports Exerc*, 36:533-53, 2004.

Primola-Gomes TN, Campos LA, Lauton-Santos S, Balthazar CH, Guatimosim S, Capettini LS, Lemos VS, Coimbra CC, Soares DD, Carneiro-Junior MA, Quintão-Junior JF, Souza MO, Cruz JS and Natali AJ. Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes. *J Appl Physiol*, 107:593-8, 2009.

Quintão-Junior JF, Natali AJ, Carneiro-Junior MA, de Castro CA, Drummond LR, Lavorato VN, Felix LB, Cruz JS and Primola-Gomes TN. Morphology and contractility in cardiomyocytes of rats with low exercise performance. *Arq Bras Cardiol*, 98:431-6, 2012.

Rebello RMC, Schreckenber R and Schluter KD. Adverse cardiac remodelling in spontaneously hypertensive rats: acceleration by high aerobic exercise intensity. *J Physiol*, 590:5389-400, 2012.

Roman-Campos D, Carneiro-Junior MA, Primola-Gomes TN, Silva KA, Quintão-Junior JF, Gondim AN, Duarte HL, Cruz JS and Natali AJ. Chronic exercise partially restores the transmural heterogeneity of action potential duration in left ventricular myocytes of spontaneous hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 39:155-57, 2012.

Roman-Campos D, Duarte HL, Sales PA, Jr., Natali AJ, Ropert C, Gazzinelli RT and Cruz JS. Changes in cellular contractility and cytokines profile during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Basic Res Cardiol*, 104:238-46, 2009.

Rossoni LV, Oliveira RA, Caffaro RR, Miana M, Sanz-Rosa D, Koike MK, Do Amaral SL, Michelini LC, Lahera V and Cachofeiro V. Cardiac benefits of exercise training in aging spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 29:2349-58, 2011.

Rowland T. Endurance athletes' stroke volume response to progressive exercise: a critical review. *Sports Med*, 39:687-95, 2009.

Sabine B, Willenbrock R, Haase H, Karczewski P, Wallukat G, Dietz R and Krause EG. Cyclic GMP-mediated phospholamban phosphorylation in intact cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 214:75-80, 1995.

SBC - Sociedade Brasileira de Cardiologia. VI Brazilian Guidelines on Hypertension. *Arq Bras Cardiol*, 95:1-51, 2010.

Schlüter KD, Schreckenber R and da Costa Rebelo RM. Interaction between exercise and hypertension in spontaneously hypertensive rats: a meta-analysis of experimental studies. *Hypertens Res*, 33:1155-61, 2010.

Scriven DR, Dan P and Moore ED. Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys J*, 79:2682-91, 2000.

Serra-Grima R, Puig T, Donate M, Gich I and Ramon J. Long-term follow-up of bradycardia in elite athletes. *Int J Sports Med*, 29:934-7, 2008.

Sharman JE and Stowasser M. Australian association for exercise and sports science position statement on exercise and hypertension. *J Sci Med Sport*, 12:252-257, 2009.

Shorofsky SR, Aggarwal R, Corretti M, Baffa JM, Strum JM, Al-Seikhan BA, Kobayashi YM, Jones LR, Wier WG and Balke CW. Cellular mechanisms of altered contractility in the hypertrophied heart: big hearts, big sparks. *Circ Res*, 84:424-34, 1999.

Soci UP, Fernandes T, Hashimoto NY, Mota GF, Amadeu MA, Rosa KT, Irigoyen MC, Phillips MI and Oliveira EM. MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats. *Physiol Genomics*, 43:665-73, 2011.

Sun MW, Qian FL, Wang J, Tao T, Guo J, Wang L, Lu AY and Chen H. Low-intensity voluntary running lowers blood pressure with simultaneous improvement in endothelium-dependent vasodilatation and insulin sensitivity in aged spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*, 31:543-52, 2008.

Tada M and Katz AM. Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. *Annu Rev Physiol*, 44:401-23, 1982.

Trippodo NC and Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circ Res*, 48:309-19, 1981.

Tsai JC, Yang HY, Wang WH, Hsieh MH, Chen PT, Kao CC, Kao PF, Wang CH and Chan P. The beneficial effect of regular endurance exercise training on blood pressure and quality of life in patients with hypertension. *Clin Exp Hypertens*, 26:255-65, 2004.

Vasan RS, Larson MG, Leip EP, Evans JC, O'Donnell CJ, Kannel WB and Levy D. Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med*, 345:1291-7, 2001.

Veras-Silva AS, Mattos KC, Gava NS, Brum PC, Negrao CE and Krieger EM. Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*, 273:H2627-31, 1997.

Weeks KL and McMullen JR. The athlete's heart vs. the failing heart: can signaling explain the two distinct outcomes? *Physiology (Bethesda)*, 26:97-105, 2011.

Wegener AD, Simmerman HK, Lindemann JP and Jones LR. Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation. *J Biol Chem*, 264:11468-74, 1989.

Weiner RB and Baggish AL. Exercise-induced cardiac remodeling. *Prog Cardiovasc Dis*, 54:380-6, 2012.

Whelton SP, Chin A, Xin X and He J. Effect of aerobic exercise on blood pressure: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Intern Med*, 136:493-503, 2002.

Williams B. The year in hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 55:65-73, 2009.

Wisloff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL and Ellingsen O. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 54:162-74, 2002.

Wisloff U, Loennechen JP, Falck G, Beisvag V, Currie S, Smith G and Ellingsen O. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. *Cardiovasc Res*, 50:495-508, 2001.

Wisloff U, Najjar SM, Ellingsen O, Haram PM, Swoap S, Al-Share Q, Fernstrom M, Rezaei K, Lee SJ, Koch LG and Britton SL. Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. *Science*, 307:418-20, 2005.

8. ANEXOS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-000 - Telefone: (31) 3899-3783

Viçosa, 19 de agosto de 2011

Ilmo. Sr.
Prof. Antônio José Natali
Coordenador do Projeto
Departamento de Educação Física

Semhor Coordenador,

Após avaliação da Metodologia utilizada no Projeto de Pesquisa nº 48/2011 e intitulado “*Avaliação dos efeitos do treinamento físico e do destreino sobre a morfologia e função de cardiomiócitos isolados de ratos hipertensos e normotensos*”, a CEUA/UFV emite parecer favorável ao protocolo de utilização de animais proposto, baseado nas Normas para o uso de animais no ensino, pesquisa e extensão do DVT/UFV, no Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, nas Normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e na legislação vigente.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Cláudio C. Fonseca', written over a horizontal line.

Prof. Cláudio C. Fonseca

Comissão de Ética para o Uso de Animais da UFV



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-000 - Telefone: (31) 3899-3783

CERTIFICADO

A Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA)/UFV certifica que o processo n.º 48/2011, intitulado “*Avaliação dos efeitos do treinamento físico e do destreinamento sobre a morfologia e função de cardiomiócitos isolados de ratos hipertensos e normotensos*”, coordenado pelo Prof. Antônio José Natali, do Departamento de Educação Física, está de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em 19/08/2011.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 48/2011, named “*Evaluation of the effects of physical training and detraining on the morphology and function of cardionocytes isolated from hypertensive and normotensive rats*” is in agreement with the Medical Veterinary Professional Ethics Code, with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and with actual Brazilian legislation. This Institutional Commission on August 19, 2011 approved this process.

Viçosa, 19 de agosto de 2011

Comissão de Ética para o Uso de Animais da UFV
(CEUA / UFV)

